

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Sélection de peptides aptamères inhibiteurs de l'expression dépendante du couple régulateur-promoteur LuxR-pluxI

Hallez, Régis

Award date:
2001

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Sélection de peptides aptamères inhibiteurs de l'expression dépendante
du couple régulateur-promoteur *LuxR-pluxI***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Régis HALLEZ

Juin 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Sélection de peptides aptamères inhibiteurs de l'expression dépendante du couple régulateur-promoteur LuxR-*luxI*

HALLEZ Régis

Résumé

De nombreux processus intracellulaires sont sujets à différentes formes de régulation. L'étude de ces régulations nécessite notamment des outils permettant d'inhiber spécifiquement l'activité des clés moléculaires de ces régulations. Les banques de peptides aptamères constituent à ce titre un système particulièrement intéressant. Au cours de ce travail, une banque de peptides aléatoires fusionnés à une protéine cytoplasmique a été utilisée pour sélectionner des peptides inhibiteurs de l'activité du régulateur transcriptionnel LuxR associé au phénomène de Quorum Sensing chez la bactérie luminescente *Vibrio fischeri*

Deux systèmes permettant de sélectionner, au sein de la banque de peptides aléatoires, des peptides aptamères capables de modifier l'activité de ce régulateur ont été mis au point. Il s'agit du système rapporteur basé sur le gène toxique *ccdB* et celui basé sur le gène à toxicité conditionnelle *pyrF*. Ce dernier a permis de sélectionner deux peptides inhibant l'expression du gène *pyrF* placé sous la dépendance du promoteur *luxI* et du régulateur LuxR. Ces mêmes peptides ont fait l'objet de tests basés sur la production de bioluminescence et se sont montrés capables d'inhiber cette production de luminescence. La détermination des séquences nucléotidiques encodant ces deux peptides nous a montré qu'ils sont de séquences identiques. La structure de l'extrémité carboxy-terminale de ce peptide montre des similitudes structurales à la N-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone, acyl-homosérine lactone inductrice de LuxR.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2001

Promoteur: Prof. X. De Bolle

Je remercie le professeur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir offert la possibilité de faire ce mémoire dans son laboratoire.

Un grand merci à Maître Poos pour m'avoir inculqué les bases de la biologie moléculaire en laboratoire, ainsi que quelques notions de variétés françaises même s'il y a encore beaucoup de travail à fournir dans ce domaine.

Je remercie l'éminent professeur Xavier De Bolle pour toutes ces explications et ces conseils si précieux.

Je remercie Art, M., Bertrand, L., Pascal, Th. et Vandenhautte, J. pour leur lecture critique de ce mémoire.

Merci à Garçon et Manu pour ces batailles d'eau si rafraîchissantes autour de la paillasse.

Merci à toi Val pour toutes ces discussions sur l'art de la pêche (Rendez-vous en juillet pour vider la Meuse).

Je remercie Valoche pour avoir évité de nous faire écouter trop souvent Queen.

Je remercie également David pour m'avoir expliqué la façon dont un laboratoire était hiérarchisé et la place qu'occupait un mémorant dans cette hiérarchie (J'ai pas oublié , après le chien).

Merci à Bernard pour m'avoir fait découvrir le monde du Quorum Sensing (Je te le dis une dernière fois Bernie, sache que j'ai toujours raison).

Un grand merci à tous les gens du labo qui à un moment ou à un autre ont répondu à mes questions ou m'ont encouragé tout au long de ce périple.

Merci à Bigjim d'avoir passé tous ces moments de joie au labo (et d'avoir gardé si précieusement le fantôme du labo près de lui). Rendez- vous pour fêter le début des vacances.

Je remercie par la même occasion tous les étudiants de 2° licence qui ont partagé tous ces moments de plaisir et de galère.

Je remercie mes parents pour m'avoir offert ces études tant espérées. C'est le plus cadeau que vous pouviez me faire.

J'aimerais finalement remercier la personne qui partage ma vie et qui compte énormément pour moi. Merci Emilie pour ta patience et ton soutien.

Abbreviations

Kda	:kilodalton
ATP	:Adenosine triphosphate
AMP	:Adénosine monophosphate
ADN	:Acide désoxyribonucléique
ARN	:Acide ribonucléique
ORF	:open reading frame
pb	:paire de bases
kpb	:kilo paire de bases
RNAP	:ARN polymérase
ThyA	:thymidylate synthase
ACP	:Acyl carrier protein
SAM	:S-adenosyl méthionine
AI	:Autoinducteur
OPL	:opéron gauche
OPR	:opéron droit
HSL	:Homosérine lactone
OHHL	:N-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone
OHL	:N-(Octanoyl)-homosérine lactone
HHL	:N-(hexanoyl)-homosérine lactone
OdDHL	:N-(3-oxododecanoyl)-homosérine lactone
BHL	:N-(butyryl)-homosérine lactone
DDHL	:N-(3-dodecanoyl)-homosérine lactone
UMP	:Uridine monophosphate
OMP	:Orotidine 5'-monophosphate
a.a	:acide aminé
5-FOA	:5-fluoroorotic acid
rpm	:rotation par minute
DO	:densité optique
Tm	:température de melting

Table des matières

Table des matières	1
Introduction	5
I. Introduction générale	5
I.1. Peptides mimant un épitope	6
I.2. Peptides modulateurs de l'activité de protéines	6
I.2.1. Exemples de peptides inhibiteurs de l'activité de protéines kinase	7
I.2.2. Exemple de peptides inhibiteurs de la thymidylate synthase d' <i>E. coli</i>	8
I.3. Peptides permettant l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques	9
II. Le Quorum Sensing	10
II.1. <i>Vibrio fischeri</i> , organisme modèle du Quorum Sensing	10
II.1.1. Les acteurs du Quorum Sensing chez <i>V. fischeri</i>	11
II.1.2. Les gènes régulés par le Quorum Sensing chez <i>V. fischeri</i>	14
II.1.3. Autres éléments intervenant dans le Quorum Sensing de <i>V. fischeri</i>	15
II.2. Le Quorum Sensing régule l'expression de gènes de virulence chez des bactéries pathogènes	17
II.2.1. Exemple du Quorum Sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
II.3. Inhibiteurs du Quorum Sensing	18
III. Systèmes rapporteurs	19
III.1. Toxine bactérienne CcdB	19
III.1.1. Caractéristiques générales	19
III.1.2. Aspect moléculaire	20
III.1.3. Fonctions du module de dépendance CcdB/CcdA	21
III.2. L'OMP décarboxylase	21
Objectif du travail	22
Résultats et discussion	23

I. Constructions plasmidiques	23
I.1. Matrice	24
I.2. Clonage de la séquence codante de <i>ccdB</i>	26
I.2.1. Amplification PCR	26
I.2.2. Conditions de clonage	26
I.2.3. Recherche et obtention des clones <i>ccdB</i>	27
I.3. Caractérisation du système rapporteur <i>ccdB</i>	28
I.3.1. Le plasmide pCcdB5	28
I.3.2. Le plasmide pCcdB23	28
I.3.3. Phénotypes associés aux plasmides pCcdB5 et pCcdB23	28
I.4. Clonage de la séquence codante de <i>pyrF</i>	30
I.4.1. Amplification PCR	30
I.4.2. Conditions de clonage	30
I.4.3. Recherche et obtention des clones <i>pyrF</i>	31
I.5. Caractérisation du système rapporteur <i>pyrF</i>	31
I.5.1. Le plasmide pPyrF18	31
I.5.2. Le plasmide pPyrF15	32
I.5.3. Phénotypes associés aux plasmides pPyrF18 et pPyrF15	32
I.5.4. Caractérisations supplémentaires des deux systèmes	33
II. Sélection de peptides inhibiteurs au sein de la banque de peptides	38
II.1. Conditions de la sélection	38
II.2. Résultats de la sélection	39
II.3. Traitement des candidats	39
III. Caractérisations des clones	42
III.1. Système rapporteur pCcdB5	42
III.2. Système rapporteur pSB401	44
III.3. Système rapporteur pPyrF18	45
III.4. Séquençage des peptides	46
Conclusions et perspectives	48
Matériel et méthodes	51
I. Souches bactériennes et plasmides	51
I.1. Souches bactériennes	51

I.1.1. <i>E. coli</i> DH10B	51
I.1.2. <i>E. coli</i> JM101	51
I.1.3. <i>E. coli</i> DB3.1	51
I.1.4. <i>E. coli</i> DL101	51
I.1.5. <i>E. coli</i> JM109	51
I.2. Plasmides	52
I.2.1. pSB384	52
I.2.2. pSB401	52
I.2.3. pCcdB5	52
I.2.4. pCcdB23	52
I.2.5. pPyrF18	52
I.2.6. pPyrF15	52
I.3. Milieux de culture et antibiotiques	53
I.3.1. Milieu Luria Bertani (LB)	53
I.3.2. Milieu SOC	53
I.3.3. Milieu minimum M9	53
I.3.4. Antibiotiques	53
II. Manipulation et analyse de l'ADN	54
II. 1. Extraction d'ADN plasmidique	54
II.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i>	54
II.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i>	54
II.2. Restriction de l'ADN	55
II.3. Extraction au phénol/chloroforme	56
II.4. Précipitation à l'éthanol	56
II.5. Electrophorèse en gel d'agarose	57
II.6. Réaction de ligation	58
II.7. Transformations bactériennes	59
II.7.1. Electroporation bactérienne	59
II.7.2 Transformation chimique	60
II.7.3. Méthode de transformation rapide	61
II.8. Amplification d'ADN par PCR	61
II.8.1 PCR classique	61

II.8.2. PCR sur colonies	62
II.8.3 Purification du produit PCR.	63
II.9. Séquençage d'ADN	63
II.10. Spectrophotométrie	64
III. Tests de luminescence	65
III.1. Test de luminescence sur colonies	65
III.2. Test de luminescence en culture liquide	66
Bibliographie	67

Introduction

I. Introduction générale

Les banques de peptides aléatoires sont un outil dont le champs d'utilisation en biologie moléculaire s'est élargi considérablement ces dernières années. Ces banques sont utilisées pour mettre en évidence des ligands de cibles d'intérêt ou pour trouver de nouveaux ligands à ces cibles. En absence d'hypothèses *à priori* sur ces ligands, l'utilisation de banques de molécules est particulièrement intéressante, étant donné la grande diversité de structures présentes dans ces banques qui permet d'y trouver un ou des interactants. On peut par exemple utiliser ces libraries pour isoler des « mimotopes » (peptides mimant un épitope) pour un anticorps monoclonal (Lenstra *et al.*, 1992), des peptides modulant l'activité de protéines (Colas *et al.*, 1996 ; Frangioni *et al.*, 2000) ou encore des peptides qui permettent l'identification des protéines d'intérêt (des cibles potentielles pour des médicaments par exemple).

Parmi les différentes banques de peptides existantes, les librairies de peptides fusionnés à des protéines cytoplasmiques (protéines « carrier ») vont nous intéresser plus particulièrement. Ce type de banques de peptides est obtenu par fusion génétique d'oligonucléotides aléatoires encodant les peptides, à la séquence codante de la protéine « carrier » présente sur un plasmide. Les protéines de fusion résultantes sont dénommées « aptamères ».

Chaque cellule transformée par un plasmide de la banque exprimera un seul peptide fusionné à la protéine «carrier ». La taille de la banque, déterminée par le nombre de clones recombinants obtenus, conditionne la probabilité d'y trouver un peptide ayant les caractéristiques requises. Plus la banque sera grande, plus les chances d'y trouver un peptide aptamère spécifique seront élevées.

La protéine « porteuse » (protéine « carrier ») de peptides a pour rôle de protéger les peptides de l'activité du protéasome (dégradations protéolytiques intracellulaires) et de les présenter dans le cytoplasme. Pour assurer ces fonctions, cette protéine doit de préférence prendre sa conformation finale sans l'intervention de protéines chaperonnes, présenter de larges boucles peptidiques au solvant (pour l'exposition des peptides aléatoires) et pouvoir être exprimée en grande quantité sous forme soluble. C'est le cas par exemple de la nucléase staphylococcale (Colas *et al.*, 1996), de la thiorédoxine d'*Escherichia coli*, représentée à la figure 1, (Colas *et al.*, 1996 ; Cohen *et al.*, 1998 ; Kolonin *et al.*, 1998 ; Geyer *et al.*, 1999 ; Blum *et al.*, 1999) ou encore la protéine hybride *cro*- β -galactosidase d'*E. coli* (Lenstra *et al.*, 1992).

1.1. Peptides mimant un épitope

Une des applications les plus intéressantes des banques de peptides est la recherche de mimotopes (peptides qui miment un épitope). C'est dans ce but que l'équipe de J.A. Lenstra a construit deux banques de peptides, dont une a été utilisée au cours de ce mémoire (Lenstra *et al.*, 1992). Ces peptides de séquence aléatoire sont exprimés en fusion à une protéine; les banques sont alors criblées par un anticorps afin d'isoler des peptides reconnus par cet anticorps. Des séquences nucléotidiques aléatoires (17 ou 23 nucléotides) ont été fusionnées à la séquence nucléotidique d'une protéine hybride (*cro*- β -galactosidase) dans le vecteur d'expression pCL627 et l'expression de cette protéine hybride est placée sous le contrôle du promoteur P_R du phage λ (figure 2). La potentialité de ces banques a été confirmée par la sélection de mimotopes, au sein de ces deux banques, par « immunoscreening » de colonies, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de surface du coronavirus porcine TGEV (transmissible gastroenteritis virus).

1.2. Peptides modulateurs de l'activité de protéines

De nombreux processus intracellulaires, notamment bactériens, sont sujets à différentes formes de régulation. Les facteurs de transcription permettent par exemple de réguler l'expression de gènes alors que les protéines kinases régulent l'activité de

protéines. Ces deux types de régulateurs protéiques jouent un rôle important dans les réponses d'une bactérie face aux conditions environnementales dans lesquelles elle se trouve à un moment donné. L'étude de ces régulateurs peut donc nous permettre de comprendre comment une bactérie, ou une population bactérienne, s'adapte à son environnement.

Une façon simple d'étudier l'activité d'un régulateur protéique est d'analyser le phénotype qui résulte de l'inactivation, par délétion ou par mutation, du gène l'encodant. Toutefois, la délétion d'un gène abolit complètement la fonction de la protéine encodée par ce gène, ce type d'inactivation se révélant parfois létale. Il est donc plus intéressant de pouvoir moduler l'activité d'un régulateur, par exemple en utilisant des molécules inhibitrices, ou activatrices, du régulateur ou d'un de ses cofacteurs. Cependant, ce type de molécules manque souvent de spécificité. En effet, en utilisant des analogues de substrat communs à plusieurs régulateurs, comme c'est actuellement souvent le cas, on risque d'inhiber d'autres facteurs protéiques que celui étudié. Or, les peptides inhibiteurs identifiés par criblage de banques de peptides aléatoires sont souvent très spécifiques de la cible utilisée pour le criblage. Il est par exemple possible d'isoler des inhibiteurs peptidiques de l'activité de protéines par « phage display » (banque de peptides aléatoires fusionnés à une protéine de surface de phages) (Hyde-DeRuyscher *et al.*, 2000). Toutefois, l'utilisation de banques de peptides aptamères (peptides présentés dans un environnement cytoplasmique) permet de sélectionner des inhibiteurs peptidiques *in vivo*.

1.2.1. Exemples de peptides inhibiteurs de l'activité de protéines kinase

Parmi les régulateurs de fonctions intracellulaires les plus étudiés figurent les protéines kinases, enzymes intervenant notamment dans les cascades de transduction du signal. Un peptide pouvant inhiber une protéine kinase interagira le plus souvent avec le site actif de l'enzyme, ou provoquera un changement conformationnel inactivant l'enzyme. Puisque le substrat d'une protéine kinase est une protéine, il est tout à fait concevable que le criblage d'une banque de peptides puisse permettre de trouver un inhibiteur compétitif du substrat. Deux types de peptides sont attendus, soit des peptides de séquences similaires à la séquence du substrat, peptides étant

considérés alors comme des analogues de substrat, soit des peptides de séquences différentes mais interagissant au même site ou à un autre site de la protéine.

Citons par exemple Cohen *et al.* qui ont découvert des peptides inhibiteurs de l'activité de la Cdk2 humaine (cyclin-dependent kinase 2, sérine/thréonine kinase requise pour l'entrée en phase S du cycle cellulaire), lors du criblage par test double-hybride d'une banque de peptides de 20 résidus fusionnés à la thiorédoxine d'*E. coli* (TrxA) (Cohen *et al.*, 1998).

Deux des peptides interagissant avec la Cdk2 humaine ont été testés, *in vitro*, avec deux protéines kinases de l'espèce *Drosophila melanogaster* (la DmCdc2 et la Dmcdc2c), protéines homologues à la Cdk2 humaine et requises lors de la prolifération cellulaire au cours du développement des yeux. Chacun des deux peptides s'est montré capable d'interagir spécifiquement avec une des deux protéines kinases (Kolonin *et al.*, 1998). Ces deux peptides ont ensuite été exprimés *in vivo* et leur effet inhibiteur de kinase a engendré la dérégulation du développement des yeux (Kolonin *et al.*, 1998).

C'est également à partir d'une banque de peptides fusionnés à la thiorédoxine d'*E. coli* qu'un peptide interagissant avec la protéine kinase Cbk1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été isolé. Ce peptide, inhibiteur de l'activité de Cbk1, a permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine dans la réponse de la levure aux phéromones sexuelles (Geyer *et al.*, 1999).

1.2.2. Exemple de peptides inhibiteurs de la thymidylate synthase d'*E. coli*

Blum *et al.* ont été les premiers à utiliser une banque de peptides aptamères chez les bactéries (Blum *et al.*, 1999). Cette banque est constituée de peptides aléatoires de 16 acides aminés fusionnés à la thiorédoxine d'*E. coli* (au niveau du site actif) dont l'expression, placée sous le contrôle du promoteur araBAD d'*E. coli*, est inductible. Les bactéries dans lesquelles il n'y a pas la thymidylate synthase (ThyA) sont résistantes au triméthoprim et exigent de la thymine exogène. Ces deux phénotypes ont permis de sélectionner deux peptides inhibiteurs de l'activité de ThyA. Un des deux peptides a ensuite fait l'objet de tests supplémentaires. L'expression excédentaire de ThyA a permis de supprimer l'effet du peptide

inhibiteur, ce qui laisse supposer que le peptide aptamère exerce ses effets sur cette enzyme. Ensuite, un test double-hybride a permis de détecter une interaction entre ThyA et le peptide aptamère. Pour ce faire, le domaine C-terminal de la sous-unité α de l'ARN polymérase a été remplacé par ThyA et le peptide aptamère a été fusionné au domaine de liaison à l'ADN λ cl (figure 3).

Ces différents exemples nous montrent qu'il est possible de sélectionner des peptides capables non seulement d'interagir avec une protéine donnée, mais aussi d'interférer avec une fonction spécifique de cette protéine, en inhibant par exemple les interactions de la protéine avec d'autres partenaires protéiques.

1.3. Peptides permettant l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques

Les antibiotiques utilisés à ce jour agissent sur plusieurs processus cellulaires bactériens, tels que la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse protéique, la synthèse d'ARN, le métabolisme du folate ou encore la fonction assurée par l'ADN gyrase (Blum *et al.*, 1999). Cependant, les cibles moléculaires de ces antibiotiques sont peu nombreuses et l'utilisation massive de ces composés antibactériens a inévitablement mené à des problèmes de résistance des bactéries.

Les programmes de séquençage bactérien à grande échelle nous fournissent une quantité non négligeable d'informations, qui pourraient servir entre autres à découvrir de nouvelles cibles d'antibiotiques. Cependant, les informations fonctionnelles sont quant à elles bien moins nombreuses (40 % des ORF's d'*E. coli* encodent des protéines de fonction inconnue) et empêchent d'exploiter certains produits géniques comme cibles potentielles de médicaments. Les banques de peptides aléatoires peuvent contribuer à la découverte de ces nouvelles cibles pharmacologiques. En effet, des peptides inhibiteurs de la fonction d'une protéine connue ou inconnue, apportant un phénotype létal, peuvent être isolés à partir d'une banque et ainsi servir à l'identification de nouvelles cibles moléculaires (Blum *et al.*, 1999 ; Norman *et al.*, 1999 ; Hyde-DeRuyscher *et al.*, 2000). Ces peptides pourraient servir de base à l'élaboration de nouveaux médicaments (Gallop *et al.*, 1994). Des antibiotiques de nature peptidique existent (Hancock *et al.*, 1999) mais l'utilisation médicale de

peptides inhibiteurs d'une cible intracellulaire se heurte à leur rapide élimination en milieu biologique. En effet, les peptides présentent un profil pharmacocinétique défavorable dû à leur faible biodisponibilité (poids moléculaire élevé, faible absorption par voie orale, absence de systèmes transporteurs spécifiques dans la paroi intestinale) et à leur instabilité métabolique (dégradation rapide par les peptidases endogènes et élimination rapide par voie biliaire et rénale) (Gordon *et al.*, 1994). Un peptide constitue en fait une molécule « leader » qui servira de base à l'élaboration de molécules non-peptidiques très efficaces, par exemple des peptidomimétiques, de poids moléculaire plus faible et présentant des caractéristiques favorables au passage transmembranaire (Gordon *et al.*, 1994).

II. Le Quorum Sensing

Une population bactérienne a très longtemps été considérée comme un ensemble d'individus unicellulaires, indépendants les uns des autres. Pourtant, dans les années 1970, l'idée qu'une communauté bactérienne puisse exister a émergé. La capacité qu'ont la plupart des bactéries à percevoir leur densité cellulaire et à initier une réponse coordonnée est un phénomène commun et reconnu à ce jour.

Ce phénomène porte le nom de « Quorum Sensing » (anciennement appelé autoinduction). Les mécanismes régulés par le Quorum Sensing interviennent notamment dans la sporulation, la division cellulaire, la synthèse d'exotoxines et d'antibiotiques, le transfert conjugatif et la bioluminescence (Sitnikov *et al.*, 1995) (figure 4).

Le Quorum Sensing semble également jouer un rôle important dans la colonisation d'animaux et de plantes hôtes par des espèces bactériennes symbiotiques ou pathogènes (Greenberg, 1997).

II. 1. *Vibrio fischeri*, organisme modèle du Quorum Sensing

Vibrio fischeri est une bactérie marine Gram négative, vivant à la fois à haute densité cellulaire (10^9 - 10^{10} cellules/ml) comme symbionte luminescent du calmar *Euprymna scolopes* et de quelques poissons, et à faible densité cellulaire (moins de

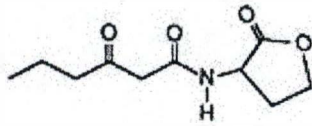


Figure 6 : Représentation de la *N*-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone (OHHL) synthétisée par LuxI (D'après Fuqua *et al.*, 1996).

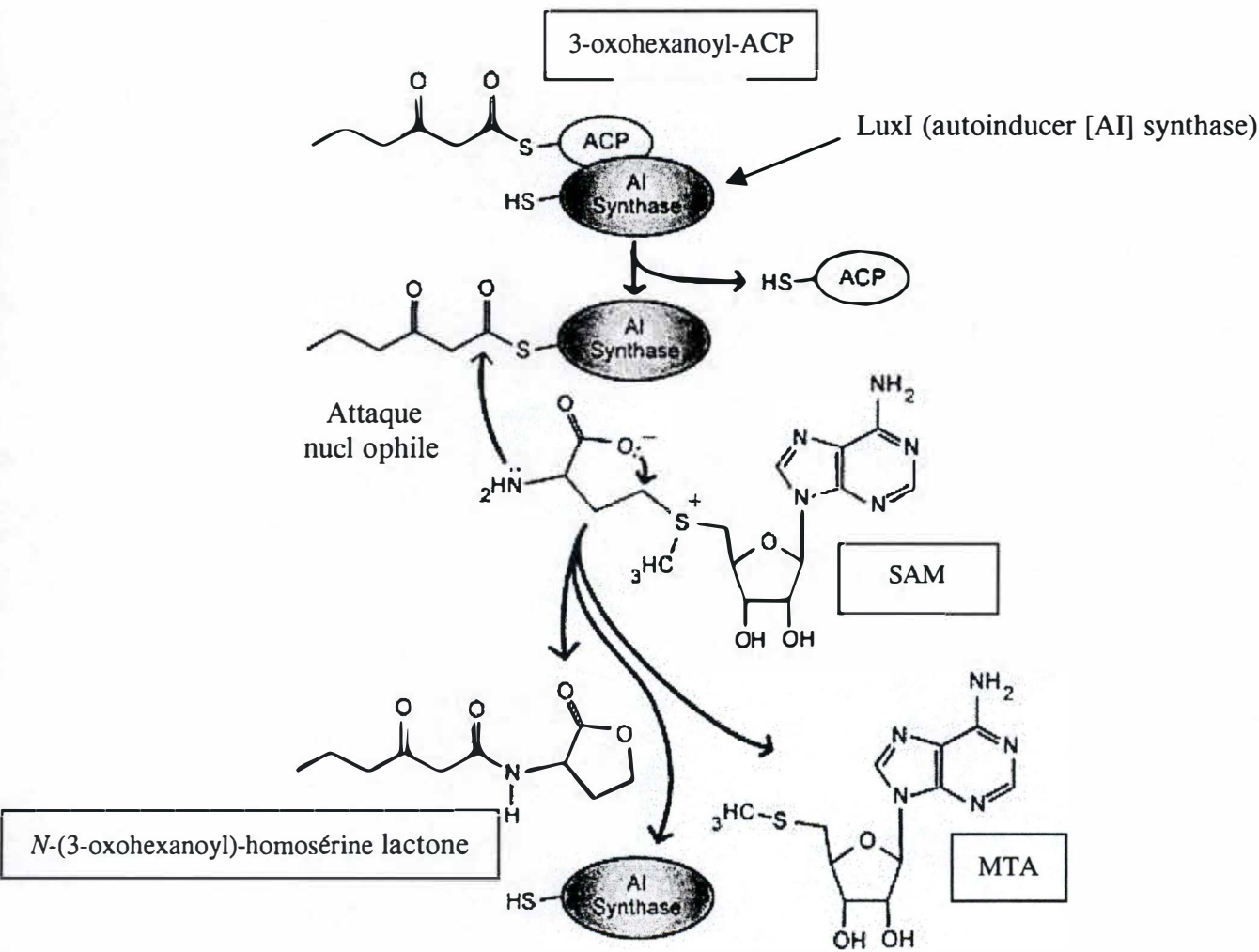


Figure 7 : Modèle proposé pour la synthèse de l'OHHL par LuxI. ACP : Acyl carrier protein, SAM : *S*-adénosylméthionine, MTA : Méthylthioadénosine. (D'après D'après Fuqua *et al.*, 1996).

10^2 cellules/ml) comme organisme libre et non luminescent (Sitnikov *et al.*, 1995 ; Dunlap, 1999). Les scientifiques savent depuis longtemps que la bioluminescence de *V. fischeri* est dépendante de la densité de population. C'est en 1972 qu'Eberhard montre que ce phénomène est dépendant de la concentration en une phéromone diffusible, la *N*-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone. Cette acyl-homosérine lactone, synthétisée par une enzyme (LuxI), s'accumule, par diffusion passive (Kaplan *et al.* 1985), dans les milieux extra- et intracellulaire des bactéries jusqu'à atteindre une concentration critique. A cette concentration, cette molécule peut interagir avec un régulateur transcriptionnel (LuxR) et l'activer. Cette protéine activera alors l'expression des gènes de luminescence regroupés en un opéron, *luxICDABEG* (figure 5).

II.1.1. Les acteurs du Quorum Sensing chez *V. fischeri*

II.1.1.1. L'acyl-homosérine lactone synthase LuxI et l'acyl-homosérine lactone OHHL

LuxI est une protéine de 193 acides aminés (25 kDa) dont les résidus 25 à 104 comprennent le site actif, alors que les résidus 104 à 164 sont impliqués dans la spécificité des substrats de l'enzyme (Dunlap *et al.*, 1999 ; Hanzelka *et al.*, 1997). Cette enzyme, responsable de la synthèse de *N*-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone (OHHL) représentée à la figure 6, catalyse la formation d'une liaison amide entre ses deux substrats, l'hexanoyl-ACP (« Acyl carrier protein ») servant de substrat d'acides gras et la *S*-adénosylméthionine (SAM) servant de substrat d'acides aminés (Val *et al.*, 1998 ; Schaefer *et al.*, 1996b, Fuqua *et al.*, 1998) (Figure 7).

Le Quorum Sensing, bien que présent chez la plupart des bactéries, diffère selon la nature des molécules diffusibles produites par les bactéries. D'une manière générale, les bactéries Gram négatives produisent principalement des phéromones de type acyl-homosérine lactone (via l'activité d'une synthase) alors que les bactéries Gram positives produisent plutôt des peptides (Dunny *et al.*, 1999) nécessitant un système de transporteurs protéiques spécifiques (de type ABC, pour « ATP binding cassette ») et une protéine kinase comme senseur (système à deux composants, avec un

régulateur de réponse) (Bassler *et al.*, 1999). La figure 8 représente ces deux types de Quorum Sensing.

Remarquons finalement que LuxI ainsi que ses homologues sont peu spécifiques, en ce sens qu'elles sont capables de synthétiser plusieurs acyl-HSL.

II. 1.1.2. Le régulateur transcriptionnel LuxR

LuxR, régulateur transcriptionnel des gènes de luminescence chez *V. fischeri*, est une protéine associée au feuillet interne de la membrane plasmique (Kolibachuk *et al.*, 1993). Ce régulateur semble être actif sous la forme d'un dimère (Fuqua *et al.*, 1996).

LuxR appartient à la superfamille LuxR des facteurs de transcription, comprenant les régulateurs MalT, GerE, NarL,... Les protéines appartenant à cette famille possèdent un motif HTH (« Helix-turn-helix ») impliqué dans la liaison à l'ADN (Egland *et al.*, 2001).

Cette protéine de 250 acides aminés comprend deux domaines, un domaine amino-terminal (résidus 20 à 156) défini comme le module de régulation et un domaine carboxy-terminal (résidus 163 à 250) défini comme le module d'activation (figure 9). Le domaine N-terminal contient le site de liaison à l'autoinducteur (AI) (résidus 79 à 127) et le domaine de régulation (résidus 20 à 58 et 138 à 162). Le domaine C-terminal contient quant à lui le site de liaison à l'ADN (résidus 184 à 230) et le site d'activation de la transcription des gènes de luminescence (résidus 210 à 250). Ces 40 derniers acides aminés, requis pour la transcription de *luxICDABEG* mais pas pour la liaison à l'ADN ni pour l'autorégulation transcriptionnelle de l'expression de LuxR (Choi *et al.*, 1992), semblent intervenir dans le recrutement de la machinerie de transcription. Une protéine LuxR dont les résidus 10 à 20 ont été délétés n'est plus capable de réguler l'expression de *luxR* alors qu'elle continue à activer la transcription des gènes de luminescence. Ces 10 résidus du domaine amino-terminal semblent donc jouer un rôle important dans l'autorégulation de l'expression de *luxR* (Choi *et al.*, 1991).

La surproduction de LuxR provoque la formation de corps d'inclusion et empêche sa purification (Kaplan *et al.*, 1987). Cependant, la production de protéines tronquées par

délétions N-terminales (Choi *et al.*, 1991) ou C-terminales (Choi *et al.*, 1992) ont permis d'effectuer des tests *in vitro* et de comprendre le mode de fonctionnement de LuxR.

Il est à ce jour évident que l'OHHL se lie à LuxR au niveau du domaine N-terminal (Hanzelka *et al.*, 1995). Un modèle a été proposé selon lequel, en absence d'OHHL, le domaine amino-terminal masquerait le domaine C-terminal et empêcherait celui-ci d'interagir avec l'ADN et d'activer la transcription des gènes de luminescence. L'OHHL interagissant avec le domaine N-terminal permettrait la dimérisation de LuxR ainsi que la libération du module d'activation (Choi *et al.*, 1991). Des tests *in vitro* sur le domaine carboxy-terminal de LuxR ont permis de montrer que ce domaine et l'ARN polymérase (RNAP) se lient coopérativement à la « boîte *lux* » (répétition inversée de 20 pb centrée en position -42,5 du site +1 de la transcription de *luxI*) et au promoteur de *luxI*, alors que ces deux éléments pris isolément en sont incapables dans les tests *in vitro* (Stevens *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 1997). Il semble cependant que la protéine LuxR complète soit tout de même capable, *in vivo*, de se lier à l'ADN, au niveau de la boîte *lux*, et ce en absence de RNAP. Il est probable que la RNAP comble la perte de spécificité pour la boîte *lux* de la protéine LuxR tronquée dans les tests *in vitro* (Egland *et al.*, 2000). LuxR reconnaît la séquence « *lux box* » et interagit spécifiquement avec plusieurs sites de la RNAP, à la fois en amont et en aval de la boîte *lux* (figure 10). L'activité de LuxR au niveau du promoteur de *luxI* dépend donc de ses contacts spécifiques avec la RNAP (avec la sous-unité α du domaine carboxy-terminal, α CTD, et la sous-unité σ de l'ARN polymérase) et ce de chaque côté de la boîte *lux* (Egland *et al.*, 1999 ; Stevens *et al.*, 1999). Certaines substitutions de résidus d'acides aminés dans le domaine C-terminal de LuxR abolissent les fonctions de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription (Trott *et al.*, 2001).

En résumé, la liaison de l'OHHL au domaine N-terminal de LuxR permet la dimérisation du régulateur. Le domaine C-terminal peut alors interagir avec la boîte *lux* et avec la RNAP, et permettre à l'ARN polymérase d'interagir avec le promoteur *luxI* et d'activer la transcription des gènes *luxICDABEG*.

II.1.2. Les gènes régulés par le Quorum Sensing chez *V. fischeri*

Les gènes de luminescence, chez *V. fischeri*, sont organisés en deux unités de transcription (figure 11), disposées en sens opposé et appelées opéron gauche (OP_L) et opéron droit (OP_R).

OP_L comprend le gène *luxR* encodant le régulateur transcriptionnel LuxR. OP_R comprend quant à lui sept gènes, respectivement *luxICDABEG* (*luxI* encode l'enzyme responsable de la synthèse de l'OHHL (AI) ; *luxC*, *luxD* et *luxE* encodent les composants du complexe « acide gras réductase » qui fournit un substrat aldéhyde à la luciférase ; *luxA* et *luxB* encodent les deux sous-unités (α et β) de la luciférase; *luxG* code pour une protéine dont la fonction hypothétique est une flavine mononucléotide réductase non requise pour la production de luminescence dans une souche transformée d'*E. coli*). Le fait que le premier gène de l'opéron droit soit *luxI* permet d'avoir une boucle de rétroaction positive en présence d'une concentration critique en OHHL, d'où le premier nom donné au phénomène de Quorum Sensing, l'autoinduction, reflétant une réponse coordonnée de la part de la population bactérienne.

La région d'ADN de 155 pb présente entre les deux opérons (figure 12) contient les promoteurs des deux unités de transcription, respectivement *pluxR* (promoteur de OP_L) et *pluxI* (promoteur de OP_R). Cette région comprend une séquence TATAGT de -11 à -6 (boîte -10) à partir du site +1 de la transcription de *luxI* (Egland *et al.*, 1999), une répétition inversée de 20 pb centrée en position -42,5 constituant la « boîte *lux* » (Shadel *et al.*, 1991) et un site de liaison à la protéine réceptrice de l'AMP cyclique (CRP) en position -59 à partir du site +1 de la transcription de *luxR* (Dunlap *et al.*, 1988). La « boîte *lux* » constitue le site de liaison à LuxR en présence d'OHHL. Il existe également un autre promoteur en amont de la séquence *luxC* et avec lequel LuxR interagit en absence d'OHHL (Ulitzur, 1998). En présence d'autoinducteur (OHHL) à haute concentration, LuxR régule positivement l'expression de OP_R (*luxICDABEG*) et négativement l'expression de OP_L (*luxR*). Par contre, lorsque la concentration en OHHL est faible, LuxR active la transcription de *luxR* (Shadel *et al.*, 1991). Il existe un équilibre entre la protéine LuxR monomérique en absence d'OHHL

et la protéine LuxR dimérisée en présence d'OHHL. L'autorégulation de l'expression de *luxR* permet de déplacer l'équilibre vers la droite (LuxR dimérisé) de façon à assurer un taux de synthèse constant des gènes de luminescence en fonction de la concentration en acyl-homosérine lactone.

Depuis la découverte du Quorum Sensing chez *V. fischeri*, de nombreuses études ont été effectuées et ont permis de mettre en évidence que ce phénomène régule l'expression d'autres gènes que ceux impliqués dans la bioluminescence. L'expression de plusieurs autres gènes, notamment 5 gènes encodant des protéines identifiées par électrophorèse en gel polyacrylamide à deux dimensions (Dunlap *et al.*, 2000) sont régulés par LuxR et OHHL. Il s'agit des gènes encodant les protéines QsrP (« Quorum Sensing regulated protein »), RibB (homologue de RibB d' *E. coli* encodant une synthase de 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate), AcfA et QsrV (deux protéines homologues de AcfA de *Vibrio cholerae* impliquées dans la colonisation de l'épithélium intestinal de la souris par cette espèce), QSR7 (« Quorum Sensing regulated 7 »).

II.1.3. Autres éléments intervenant dans le Quorum Sensing de *V. fischeri*

II.1.3.1. Autres partenaires protéiques et éléments régulant l'expression des gènes de luminescence

La régulation de l'expression des gènes de luminescence implique également d'autres partenaires protéiques, notamment les produits des gènes *rpoH* (la protéine HtpR) et de l'opéron *groE*. La protéine HtpR, également appelée σ^{32} , est requise pour assurer une expression suffisante des gènes *groE*. Les protéines GroE sont alors requises pour assurer la transcription des gènes de luminescence *luxICDABEG*, en permettant le repliement de la protéine LuxR dans sa conformation native, conformation qui favorise l'interaction de LuxR avec l'OHHL (Dolan *et al.*, 1992 ; Adar *et al.*, 1992).

La protéine CRP (protéine réceptrice de l'AMP cyclique) régule également l'expression des gènes de luminescence en interagissant avec une région du promoteur

de *luxR* (*pluxR*). Cette protéine est un antagoniste transcriptionnel de LuxR, puisqu'elle active l'expression de *luxR* et inhibe la transcription des gènes *luxICDABEG*, et ce en présence d'AMP cyclique (Dunlap *et al.*, 1988).

Les concentrations en fer, en glucose ainsi qu'en oxygène semblent également moduler l'expression des gènes *luxICDABEG* (Dunlap *et al.*, 1992).

Remarquons finalement que l'expression des gènes de luminescence dans l'espèce *E. coli* n'est pas perturbée et a permis d'étudier la régulation de cette expression dans cet organisme modèle de laboratoire.

II.1.3.2. Deuxième système d'autoinduction présent chez *V. fischeri*

Une autre enzyme (AinS) est impliquée dans la synthèse d'une autre acyl-homosérine lactone, le *N*-(Octanoyl)-homosérine lactone (OHL représentée à la figure 13), qui n'active la transcription des gènes de luminescence qu'en absence d'OHHL. Cette synthase (45,580 kDa), n'a aucune similarité avec LuxI ou n'importe quelle protéine homologue de LuxI. Cependant, AinS est homologue à l'enzyme responsable de la synthèse d'acyl-HSL chez *V. harveyi*, à savoir LuxM (Gilson *et al.*, 1995, Hanzelka *et al.*, 1999). Il s'avère que l'OHL inhibe de façon compétitive l'association de l'OHHL à LuxR, l'expression des gènes de luminescence étant donc inhibée en présence de ces deux acyl-homosérines lactones (Kuo *et al.*, 1996). L'hypothèse avancée par Kuo *et al.* (Kuo *et al.*, 1996) est que l'activité spécifique d'OHL, plus faible que celle d'OHHL, ne permet qu'un changement conformationnel minimal de LuxR. Ce changement conformationnel donnerait un complexe LuxR-OHL de plus faible affinité pour la boîte *lux* (site de liaison de LuxR dans la région régulatrice des gènes de luminescence) ou ayant une capacité plus faible à faciliter l'association de RNAP au *pluxI*. Les deux acyl-HSL étant produites à un niveau basal à faible densité cellulaire, l'OHL jouerait donc un rôle important dans l'inhibition de la transcription des gènes de luminescence en condition de faible densité cellulaire et ne permettrait d'activer l'expression de ces gènes qu'en présence d'une concentration en OHHL élevée et donc d'une densité cellulaire élevée.

Cette OHL est capable d'interagir également avec une protéine kinase, AinR, qui semble réguler l'expression de gènes différents de ceux régulés par LuxR (Gilson *et al.*, 1995).

Finalement, l'espèce *V. fischeri* est capable de synthétiser une troisième phéromone, le *N*-(hexanoyl)-homosérine lactone (HHL) également produite par LuxI. (figure 14).

II.2. Le Quorum Sensing régule l'expression de gènes de virulence chez des bactéries pathogènes

Il s'est avéré que le Quorum Sensing est un phénomène utilisé couramment chez de nombreuses bactéries pathogènes. En effet, ce système permet de réguler l'expression de gènes impliqués dans la virulence de certaines bactéries et permet à celles-ci d'attaquer leur hôte de manière coordonnée, donc plus efficacement.

II.2.1. Exemple du Quorum Sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste de l'homme, responsable d'infections respiratoires chez des patients atteints de la mucoviscidose ou immunodéprimés. Cette bactérie possède au moins deux systèmes de Quorum Sensing responsables du contrôle de l'expression d'une batterie de gènes de virulence, encodant notamment des enzymes extracellulaires et des exotoxines (Williams *et al.*, 2000). Il semble qu'un de ces deux systèmes soit également impliqué dans la maturation des biofilms chez cette espèce (Parsek *et al.*, 2000).

Le premier système de Quorum Sensing comprend l'enzyme LasI, responsable de la synthèse de *N*-(3-oxododecanoyl)-homosérine lactone (OdDHL représentée à la figure 15A) (Pearson *et al.*, 1994), et le régulateur LasR. Ces deux protéines (LasI et LasR) sont respectivement homologues à LuxI et LuxR. Contrairement aux gènes *luxR* et *luxI*, les gènes *lasR* et *lasI* sont transcrits dans la même direction (Salmond *et al.*, 1995). Le complexe LasR-OdDHL régule l'expression de *lasB*, qui encode une élastase impliquée dans la virulence de la bactérie. Ce complexe affecte également l'expression de *lasA* (encodant une deuxième élastase), d'*apr* (encodant une protéase

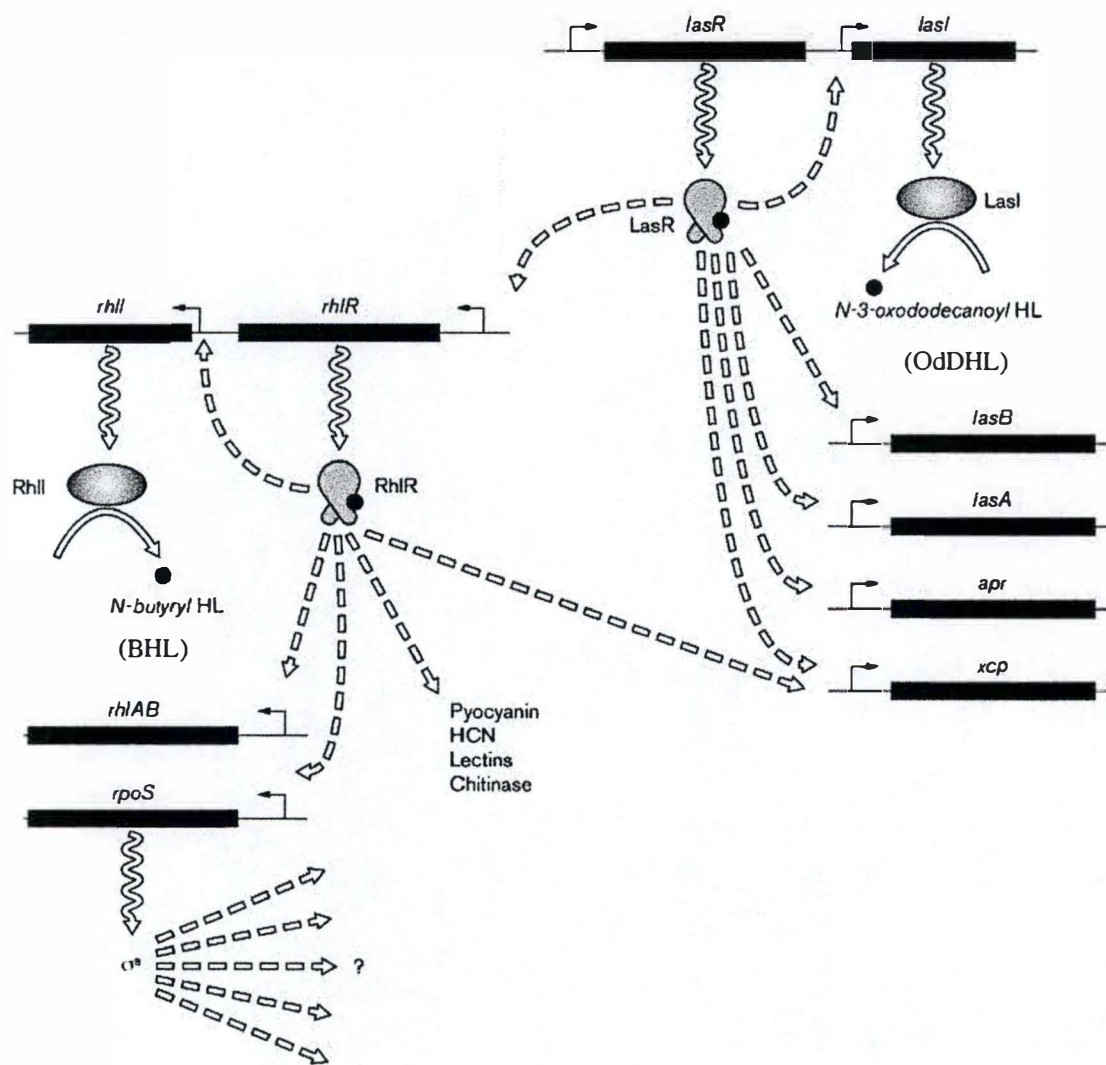


Figure 16 : Schéma du modèle du Quorum Sensing et des interactions connues entre les deux systèmes de Quorum Sensing chez *P. aeruginosa*. (D'après Fuqua *et al.*, 1998).

alcaline) et des gènes *xcp* encodant des protéines membranaires impliquées dans le mécanisme de sécrétion. L'expression de *lasI* est régulée positivement par LasR-OdDHL et correspond encore une fois à une autoinduction (De Kievit *et al.*, 2000).

Le deuxième système de Quorum Sensing chez *P. aeruginosa* comporte deux protéines également homologues à LuxI et LuxR, à savoir RhlI et RhlR. RhlI est responsable de la synthèse de *N*-(butyryl)-homosérine lactone (BHL représentée à la figure 15B) (Pearson *et al.*, 1995). Cette acyl-HSL se lie à RhlR et le complexe formé active l'expression de *rhlAB* dont les produits sont requis pour la biosynthèse des rhamnolipides, de *rpoS* (facteur sigma impliqué dans la régulation d'un grand nombre de gènes liés à la réponse au stress), mais aussi des gènes *xcp* et de *rhlI*.

Les deux protéines régulatrices (LasR et RhlR) montrent une certaine spécificité de substrat, mais il existe des connections entre les deux systèmes. La figure 16 résume le mode de fonctionnement de ces deux systèmes.

Il s'est avéré qu'il existe des séquences « *lux box* » devant les gènes *lasB*, *lasA*, *lasI*, *lasR*, *rhlA*, *rhlI* et *rhlR* (Grayet *et al.*, 1994).

La découverte d'une troisième molécule de signal a augmenté le degré de complexité du Quorum Sensing chez cette bactérie. Il s'agit du 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS pour « *Pseudomonas* quinolone signal », représentée à la figure 15C).

II.3. Inhibiteurs du Quorum Sensing

Le fait que le Quorum Sensing puisse contrôler plusieurs systèmes génétiques selon l'espèce bactérienne, notamment l'expression de gènes de virulence chez certaines bactéries pathogènes, a motivé la recherche de composés inhibiteurs de cette communication interbactérienne. Il existe par exemple des composés capables de se lier à LuxR et d'inhiber la liaison d'OHHL à LuxR ainsi que l'activation de l'expression des gènes de luminescence. Les inhibiteurs de LuxR identifiés à ce jour sont des analogues de *N*-(3-Oxohexanoyl)-homosérine lactone (Schaefer *et al.*, 1996a) ou des furanones produits par l'algue *Delisea pulchra* (Givskov *et al.*, 1996) représentées à la figure 17.

Il est évident que des inhibiteurs spécifiques du Quorum Sensing d'une espèce bactérienne constitueraient des composés antibactériens très intéressants. En effet, les gènes de virulence, régulés par un mécanisme de Quorum Sensing chez une bactérie pathogène, ne sont en général pas des gènes requis pour la survie de la bactérie. La pression de sélection imposée par ce type d'inhibiteur serait bien moindre que celle engendrée par les antibiotiques utilisés à ce jour et diminuerait donc l'émergence de résistances, dues à la sélection imposée qui ne permet la survie que des bactéries résistantes (mutants).

III. Systèmes rapporteurs

La sélection de peptides modulant l'activité d'un régulateur nécessite un système rapporteur présentant un phénotype discriminant et, dans le cadre de ce travail, notre choix s'est porté sur des rapporteurs létaux. Les deux systèmes utilisés au cours de ce mémoire sont décrits dans les paragraphes suivants.

III.1. Toxine bactérienne CcdB

III.1.1. Caractéristiques générales

La mort cellulaire programmée existe chez les procaryotes et est médiée par deux partenaires, une toxine stable et une antitoxine instable qui empêche l'action de la toxine. Il existe parmi ces différents systèmes les gènes *ccdB/ccdA*, soit sous la forme d'un module de dépendance (« addiction module ») sur le plasmide F (un plasmide de 95 kpb à faible nombre de copie), soit présents sur un chromosome.

Les caractéristiques d'un module de dépendance sont (Engelberg-Kulka *et al.*, 1999) :

- deux gènes adjacents (*ccdB* et *ccdA*) dont l'un code pour une protéine toxique à longue durée de vie (CcdB) alors que l'autre code pour une protéine de courte durée de vie (CcdA) qui annihile l'effet toxique de la première
- l'antitoxine est encodée par le gène placé en amont dans le module
- les deux gènes sont coexprimés
- la protéine antitoxique est synthétisée en excès par rapport à la protéine toxique

- les deux protéines sont de petites tailles (101 a.a. et 11.7 kDa pour CcdB ; 72 a.a. et 8.7 kDa pour CcdA)
- ces deux protéines interagissent
- l'antitoxine est dégradée par une protéase spécifique (Lon)
- le module est autorégulé négativement au niveau transcriptionnel par le complexe CcdB/CcdA

Une bactérie ayant perdu le plasmide F est condamnée à mourir puisque l'antitoxine CcdA se fait très rapidement dégrader par la protéase Lon alors que la toxine CcdB subsiste et fait ressentir son effet toxique (figure 18), à savoir une synthèse réduite d'ADN, l'activation du système SOS, une filamentation cellulaire, la formation de cellules anucléées et la mort cellulaire (Couturier *et al.*, 1998).

III.1.2. Aspect moléculaire

La cible moléculaire de la toxine CcdB est la sous-unité A de l'ADN gyrase (topoisomérase II), appelée GyrA. Cette enzyme catalyse le superenroulement négatif de l'ADN (via l'hydrolyse de l'ATP), en introduisant une coupure passagère de l'ADN double brin, le temps de passer un fragment d'ADN et de refermer le double brin (figure 19). Elle comporte deux sous-unités, GyrA qui possède deux domaines (le domaine N-terminal de 59-64 kDa impliqué dans le clivage de l'ADN et le domaine C-terminal de 33 kDa constituant le domaine de liaison à l'ADN) et GyrB présentant également deux domaines (le domaine N-terminal de 43 kDa qui contient le site d'hydrolyse de l'ATP et le domaine C-terminal de 47 kDa qui interagit avec la sous-unité A de la gyrase et l'ADN) (Bahassi *et al.*, 1999). Cette topoisomérase est active sous la forme tétramérique A₂B₂ et joue un rôle important dans le maintien d'une certaine contrainte topologique de l'ADN pendant le passage des machineries de réplication, de transcription et de recombinaison (Couturier *et al.*, 1998).

CcdB existe sous forme de dimère (Kampranis *et al.*, 1999) et semble se lier à GyrA (Figure 20), ce qui engendre deux phénomènes toxiques, à savoir l'inactivation de l'ADN gyrase en formant un complexe CcdB/ADN gyrase (relaxation de l'ADN) et la

formation d'un complexe CcdB/ADN gyrase/ADN (empoisonnement de la topoisomérase II et obstruction du passage des ARN polymérases sur l'ADN).

CcdA semble quant à lui promouvoir la dimérisation des dimères de CcdB, ce qui inactiverait la toxine (Kampranis *et al.*, 1999).

III.1.3. Fonctions du module de dépendance CcdB/CcdA

La finalité d'un tel système est plus que le maintien d'un plasmide (plasmide F) dans une population bactérienne. On peut en effet considérer une colonie bactérienne comme un organisme multicellulaire qui, en conditions précaires (famine, dessiccation,...), « condamne » une sous-population particulière par activation de la mort programmée de façon à assurer la survie de l'espèce.

III.2. L'OMP décarboxylase

La synthèse *de novo* d'UMP, précurseur de tous les nucléotides pyrimidiques, implique six réactions enzymatiques consécutives, catalysées respectivement par la carbamoylphosphate synthase (*arg I*), l'aspartate transcarbamoylase (*pyr B*), la dihydroorotase (*pyr C*), la dihydroorotate oxydase (*pyr D*), l'orotate phosphoribosyltransférase (*pyr E*) et l'OMP décarboxylase (*pyr F*) (figure 21). Cette dernière catalyse la réaction de décarboxylation de l'OMP (Orotidine 5'-monophosphate) et donc la formation d'UMP (Uridine 5'-monophosphate) (Jensen *et al.*, 1984). Le produit du gène *ura3* chez la levure est un homologue de *pyrF*.

L'enzyme PyrF active est constituée de deux sous-unités identiques de 27 kDa (245 a.a.) (Turnbough *et al.*, 1987).

Le 5-FOA, analogue de pyrimidine, est converti en un composé toxique par le produit du gène *pyrF*. Sur un milieu de culture contenant ce composé, seules les cellules dont le gène *pyrF* est inactivé seront capables de croître, pour autant que le milieu fournisse la source de pyrimidine nécessaire à la croissance.

Objectif du travail

Le but de ce travail est de mettre au point un système de sélection de peptides aptamères modifiant l'activité de régulateur transcriptionnel LuxR. Pour effectuer la sélection de peptides inhibiteurs au sein d'une banque de peptides aléatoires, un système rapporteur apportant un phénotype discriminant est indispensable. Plus précisément, l'objectif de ce travail sera de tester un rapporteur (gène toxique) dont la répression permettra la survie cellulaire. Les deux rapporteurs testés seront *ccdB* et *pyrF*. Le promoteur utilisé dans ces tests sera celui du gène *luxI* (*luxI*).

En présence de *N*-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone (OHHL), LuxR activera la transcription du gène toxique et les bactéries transformées par le plasmide porteur du système seront donc tuées. En transformant une souche de bactéries portant ce plasmide par une banque de peptides aléatoires (banque de peptides fusionnés à la protéine hybride *cro*- β -galactosidase), nous espérons isoler des peptides permettant aux bactéries de survivre en inhibant, de quelque façon que ce soit, l'activité ou la production de protéines toxiques.

Nous testerons ensuite les peptides isolés avec un autre système rapporteur (tests de production de luminescence) de façon à ne garder que les peptides interférant spécifiquement avec l'activité de LuxR.

Résultats et discussion

I. Constructions plasmidiques

Le but de notre mémoire est de mettre au point un système permettant de sélectionner des peptides interagissant avec la protéine LuxR et capables d'interférer avec son activité de régulateur du promoteur de *luxI*. La sélection d'un ou de quelques peptides ayant ces caractéristiques, au départ d'une banque de peptides aléatoires, nécessite un système rapporteur, apportant un phénotype discriminant.

Dans le cadre de ce travail, le vecteur plasmidique pSB401, dérivé du pSB384 (description disponible dans matériel et méthodes) était à notre disposition (Winson *et al.*, 1998). Ce plasmide (figure 1) comporte les gènes de luminescence *luxCDABE*, sous le contrôle du promoteur *luxI*, la séquence codante de *luxR* sous le contrôle du promoteur *luxR*, le marqueur de résistance à la tétracycline et l'origine de réplication P15A. Pour une question de facilité, la région promotrice (comprenant les promoteurs *luxI* et *luxR*) est appelée *luxI*.

Le plasmide pSB401 provient du clonage de l'insert *luxR-luxI* (+/- 1000 pb) au site unique de restriction *EcoRI* du plasmide pSB384. Deux sites *EcoRI* encadrant cet insert ont été restaurés suite à ce clonage. La séquence nucléotidique de ce plasmide est entièrement connue, à l'exception des séquences correspondant aux amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification de l'insert *luxR-luxI*, c'est-à-dire à quelques nucléotides se trouvant à proximité des 2 sites de restriction *EcoRI* dans ce plasmide. Ce plasmide est classiquement utilisé comme « senseur » pour mesurer l'activité d'un extrait contenant potentiellement une phéromone bactérienne de type homosérine lactone. En présence d'une telle phéromone, le régulateur LuxR est activé et induit la transcription de l'opéron *luxCDABE*, et donc la production de

bioluminescence. L'utilisation de ce plasmide comme système rapporteur pour le criblage d'une banque de peptides inhibiteurs de LuxR nous semble difficile à mettre en œuvre. En effet, un peptide inhibiteur de l'activité de LuxR ne pourrait être mis en évidence qu'à la condition d'engendrer une diminution, voire une extinction de la luminescence produite par une colonie bactérienne, et ce au sein d'un tapis bactérien luminescent qui, lui, représenterait l'ensemble des peptides n'ayant aucune action inhibitrice sur ce régulateur. Même dans le cas où un tel criblage est possible, sa mise en œuvre s'avère très lourde. Il faudrait en effet étaler les bactéries transformées par le plasmide rapporteur pSB401 et par la banque de plasmides codant pour les peptides recombinants, de manière à obtenir des colonies isolées. Vu la taille de ces banques de peptides, cela représenterait en effet l'analyse de colonies sur plusieurs milliers de boîtes de Pétri, ce qui est difficilement envisageable.

Dans un tel cas de figure, une approche plus appropriée consiste à isoler un peptide d'intérêt non pas par criblage, mais par sélection. Pour ce faire, il faut que le peptide d'intérêt confère un phénotype sélectionnable. Dans notre cas, c'est un peptide qui, se fixant au régulateur LuxR, inhiberait sa fonction d'activation du promoteur de *luxI*, et abolirait (au moins partiellement) la transcription du gène placé sous le contrôle de ce promoteur. Si ce gène est un gène toxique pour la bactérie, seules les bactéries contenant un peptide inhibiteur de l'activité de LuxR pourront croître. Il s'agit donc bien d'un phénotype sélectionnable.

Notre choix s'est porté sur le gène toxique *ccdB* en fusion transcriptionnelle avec le promoteur de *luxI*, ce qui signifie que la séquence codante de *ccdB* remplacera les séquences *luxCDABE* dans le plasmide pSB401. Une description détaillée du gène *ccdB* et de sa toxicité se trouve dans le chapitre Introduction.

1.1. Matrice

Afin d'obtenir la matrice nécessaire pour le clonage de la séquence codante de *ccdB*, une préparation d'ADN plasmidique a été effectuée à partir d'une culture de la souche d'*E. coli* JM109 [pSB401]. Etant donné que le plasmide pSB401 est présent en faible copie dans chaque bactérie, la culture a été incubée une nuit en présence de

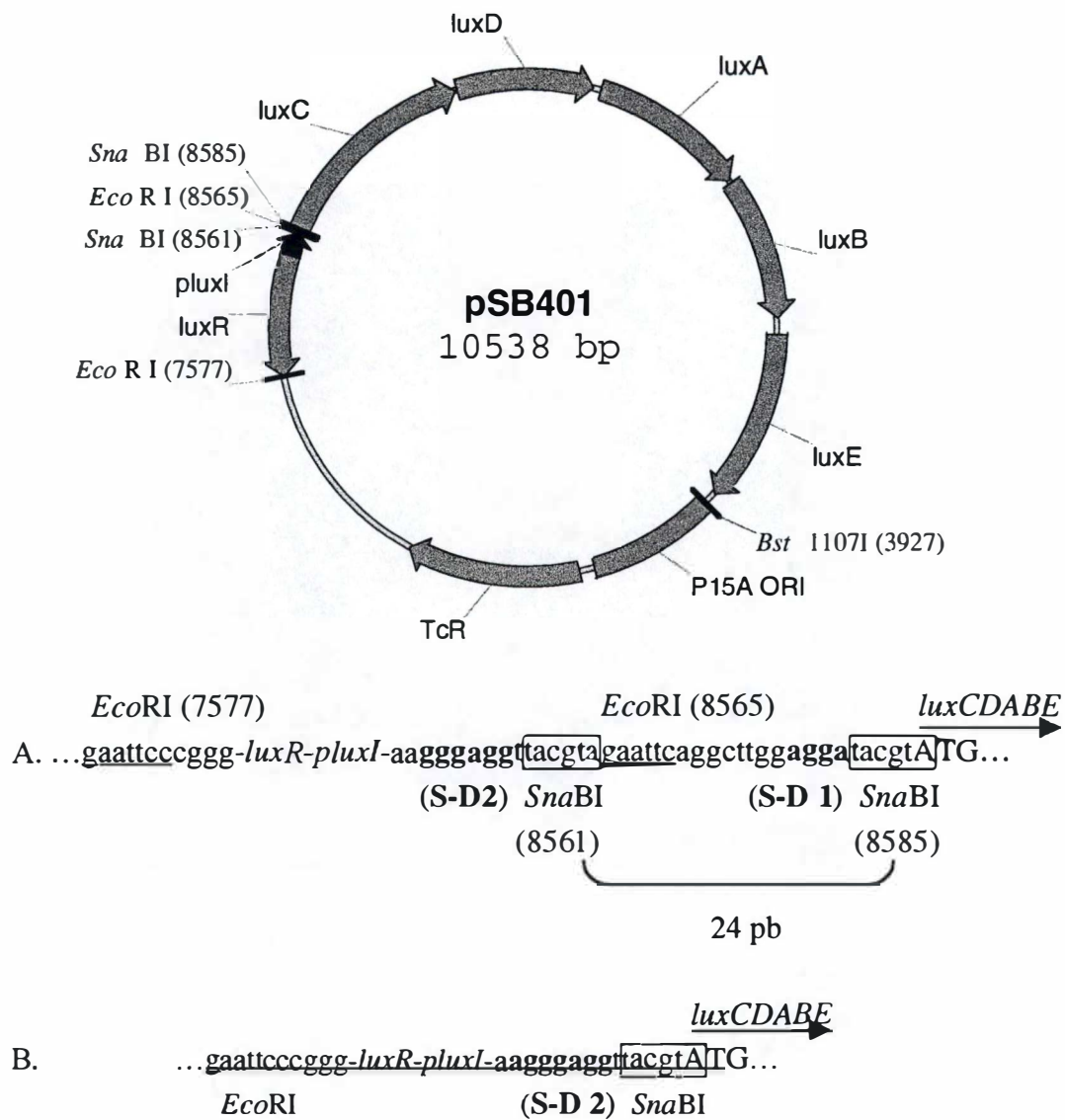


Figure 4 : A. Représentation du deuxième site *SnaBI* (8561) situé à 24 pb du site *SnaBI* connu (8585), juste avant le site *EcoRI* (8565). S-D 1 : Séquence Shine-Dalgarno. B. La restriction *SnaBI* du plasmide pSB401 et sa recircularisation engendre la perte d'une petite séquence de 24 pb comprenant le site *EcoRI* (8565). Après cette restriction, une nouvelle séquence (S-D 2) remplace celle perdue lors du clonage.

chloramphénicol afin d'augmenter le rendement de la préparation d'ADN (à peu près 30 µg obtenus pour 100 ml de culture d'*E. coli* transformées). Les sites de restriction uniques *Sna*BI et *Bst*1107I ont été choisis comme sites de clonage de la séquence codante de *ccdB*. *Sna*BI est situé entre la région promotrice *luxI* et l'ATG de *luxC* (première ORF sous le contrôle de *luxI*), et *Bst*1107I est situé, quant à lui, peu après le codon stop de *luxE* (dernière ORF placée sous le contrôle de *luxI*) (figures 1 et 2). Cette double restriction nous permettra donc d'enlever tout l'insert *luxCDABE*, sans toucher au reste du plasmide. Etant donné qu'une partie de la séquence du plasmide pSB401 est inconnue, il existe un risque qu'un deuxième site de restriction *Sna*BI ou *Bst*1107I soit présent dans les régions encadrant l'insert *luxR-luxI*.

Une série de restrictions diagnostiques (figure 3) nous a permis de confirmer que le plasmide a le profil de restriction attendu pour les enzymes testées, et qu'apparemment aucun site *Sna*BI ou *Bst*1107I supplémentaire n'est présent dans le plasmide. Néanmoins, la présence de sites supplémentaires à proximité des sites connus ne pourrait être mise en évidence par ces restrictions. C'est pourquoi, la région du plasmide proche du site *Sna*BI a été séquencée grâce aux primers pSB401 amont et *luxI* amont. Le séquençage nous a montré qu'il existait un deuxième site *Sna*BI à 24 pb du site *Sna*BI connu, juste avant le site *Eco*RI situé entre le promoteur *luxI* et la séquence codante de *luxC* (les deux sites *Sna*BI « encadrent » donc ce site *Eco*RI) (figure 4A).

Il fallait donc vérifier que la perte de la séquence comprise entre les deux sites *Sna*BI n'abolissait pas la fonction du promoteur et qu'une nouvelle séquence Shine-Dalgarno remplaçait celle perdue (cette séquence sera en effet perdue lors du clonage des gènes rapporteurs *ccdB* ou *pyrF*). Pour ce faire, le plasmide pSB401 a été restreint par l'enzyme *Sna*BI et recircularisé (figure 4B). La souche DH10B d'*E. coli* a été transformée par ce plasmide (appelé pSB401-Δ) et cinq transformants ont fait l'objet d'une préparation d'ADN et d'une restriction *Eco*RI. Cette restriction nous permet de vérifier si les clones choisis ont bien été restreints en *Sna*BI. En effet, le plasmide pSB401-Δ ne comporte plus qu'un site de restriction *Eco*RI, alors que le plasmide pSB401 en comporte deux. Un des clones qui présentait le profil de restriction attendu a été sujet à un test de luminescence sur colonies en présence d'homosérine lactone (HSL) (Figure 5). Ce test a permis de montrer que le plasmide est toujours

qualitativement fonctionnel comme senseur aux HSL et donc que les séquences codantes *luxCDABE* sont toujours bien sous le contrôle du promoteur *phxI*.

Préparation de la matrice pour le clonage du gène rapporteur toxique :

La double restriction *Sna*BI-*Bst*1107I a été effectuée sur le vecteur pSB401. Les trois fragments d'ADN résultant (5880 pb, 4634 pb et 24 pb) ont été séparés sur un gel d'électrophorèse (Figure 6), et la bande correspondant à la taille d'environ 4700 pb a été récupérée sur gel et purifiée.

1.2. Clonage de la séquence codante de *ccdB*

1.2.1. Amplification PCR

La séquence codante du gène *ccdB* a été amplifiée par PCR au moyen des amorces *ccdB* amont et *ccdB* aval. Les amorces ont été choisies de façon à n'amplifier que la séquence codante de *ccdB*, à restaurer les deux sites de restriction *Sna*BI et *Bst*1107I après le clonage du produit PCR obtenu dans la matrice préparée, ainsi qu'à permettre au codon d'initiation (ATG) de *ccdB* de se retrouver, après le clonage à bouts francs, au même endroit que celui de *luxC* dans le plasmide pSB401 (Figure 7). Cette amplification s'est faite sur l'ADN génomique de la souche JM101 dans les conditions présentées dans le chapitre Matériel et méthodes. L'amplification PCR a donné un produit de taille attendue (311 pb) et le fragment a été purifié. Les extrémités 5' des amplicons ne sont pas phosphorylées puisque nous n'avons pas utilisé d'amorces phosphorylées à leurs extrémités 5'.

1.2.2. Conditions de clonage

L'ADN ligase est capable d'établir une liaison entre un phosphate présent à l'extrémité 5' d'un brin d'ADN et un groupement hydroxyle (-OH) présent à l'extrémité 3' d'un autre brin d'ADN. Etant donné que les extrémités 5' de la matrice n'ont pas été déphosphorylées et que les amplicons PCR ne possèdent pas de

phosphate à leurs extrémités 5', la ligation se fera préférentiellement intramoléculairement et la majorité des plasmides ligués ne contiendront donc pas d'insert. Pour remédier à ce problème, la ligation a été effectuée avec un large excès d'insert par rapport à la matrice (40 X plus en nombre de molécules, soit 2.5 ng de matrice [pSB401/*Sna*BI-*Bst*1107I] et 7 ng d'insert *ccdB* purifié), de façon à favoriser la réaction d'incorporation de l'insert. Une ligation sans insert a également été réalisée en contrôle, avec la même quantité de matrice.

Ces deux mixtures de ligation ont été transformées dans une souche d'*E. coli* (DB3.1) résistante à l'effet toxique de CcdB, à raison d'approximativement 1.25 ng d'ADN de matrice par transformation. Un contrôle négatif de transformation (cellules sans ADN) a également été effectué. Nous avons obtenu le même nombre de transformants pour chacune des deux transformations, à savoir environ 50 colonies sur boîtes de milieu riche (LB).

1.2.3. Recherche et obtention des clones *ccdB*

Etant donné qu'une ligation à bouts francs permet l'incorporation d'un insert aussi bien dans un sens que dans l'autre, il fallait pouvoir distinguer les deux types de constructions plasmidiques possibles. Pour ce faire, nous savions que l'insertion de la séquence codante de *ccdB* dans le bon sens restaure les deux sites de restriction *Sna*BI et *Bst*1107I, et qu'une amplification PCR n'est possible en utilisant les amorces *pluxI* amont et *ccdB* aval que dans le cas où la séquence codante de *ccdB* est insérée dans le bon sens (Figure 8A). Par contre, l'insertion de la séquence codante de *ccdB* dans le mauvais sens ne reforme pas les deux sites de restriction *Sna*BI et *Bst*1107I, et une amplification PCR n'est possible en utilisant les primers *pluxI* amont et *ccdB* amont que dans le cas où la séquence codante de *ccdB* est insérée dans le mauvais sens (Figure 8B).

Une série de PCR sur colonies a donc été effectuée, en utilisant comme primers *pluxI* amont et *ccdB* aval ou amont. La recherche des deux clones (*ccdB* «à l'endroit» et «à l'envers») a nécessité une PCR sur respectivement 10 et 35 colonies différentes (Figure 9). Les deux clones ont été appelés CcdB5 («à l'endroit») et CcdB23 («à l'envers»). Des préparations d'ADN plasmidique ont été faites pour ces deux clones,

et nous avons obtenu respectivement 21 µg de plasmides pCcdB5 (midipréparation) et 500 ng de plasmides pCcdB23 (minipréparation).

I.3. Caractérisation du système rapporteur ccdB

I.3.1. Le plasmide pCcdB5

Des restrictions diagnostiques (*EcoRI*, *SnaBI*, *Bst1107I*, *HindIII*, et *XbaI*) ont été effectuées sur le plasmide pCcdB5 et ont confirmé que la préparation d'ADN correspond à la construction attendue. La région du plasmide comportant l'insert a ensuite été séquencée au moyen des primers pSB401 amont, *luxI* amont, *ccdB* amont et *ccdB* aval (Figure 10). Ces séquences nous montrent que l'insert *ccdB* est bien présent, dans le bon sens et à la position attendue par rapport au promoteur *luxI*, et que les deux sites *SnaBI* et *Bst1107I* ayant servi au clonage sont reconstitués comme attendu.

De plus, la restriction *EcoRI* sur le plasmide pCcdB5 ainsi que le séquençage nous ont montré que l'insert de 24 pb, compris entre les deux sites de restriction *SnaBI* et qui comporte un site *EcoRI*, a disparu (cf. Figure 4) lors du clonage de la séquence codante de *ccdB*.

I.3.2. Le plasmide pCcdB23

Le plasmide pCcdB23 a été sujet aux mêmes restrictions diagnostiques (*EcoRI*, *SnaBI*, *Bst1107I*, *HindIII*, et *XbaI*). La perte des sites *SnaBI* et *Bst1107I* a confirmé que la minipréparation d'ADN plasmidique est conforme à ce qui était attendu, à savoir la présence de la séquence codante du gène *ccdB* inséré dans l'autre sens.

I.3.3. Phénotypes associés aux plasmides pCcdB5 et pCcdB23

Nous avons ensuite transformé les plasmides pCcdB5 et pCcdB23 dans deux souches d'*E. coli* : DH10B qui est sensible à l'effet toxique de CcdB et DB3.1,

résistante à cet effet toxique. Ces deux souches ont également été transformées avec le plasmide pSB401 (transformation contrôle). Toutes ces transformations ont été déposées sur milieu un riche (LB). Nous avons obtenu des transformants pour pSB401 et pCcdB23 dans les deux souches, mais uniquement dans la souche DB3.1 pour pCcdB5. Le fait qu'aucun clone pCcdB5 dans DH10B n'ait été obtenu nous indique que le taux d'expression de *ccdB* est suffisamment élevé pour tuer les bactéries porteuses de ce plasmide. Ce taux d'expression est dû à l'activité basale du promoteur *luxI* ou à l'expression basale de la protéine régulatrice LuxR, ou plus probablement aux activités basales conjointes de ces deux éléments, malgré l'absence d'OHHL inductrice. Les transformants de pCcdB23 ont survécu dans DH10B, ce qui nous prouve que *ccdB* n'est pas exprimé, en tout cas pas à la dose létale pour cette souche, lorsque la séquence codante est insérée à l'envers dans la matrice préparée.

La construction plasmidique pCcdB5, où le gène *ccdB* sert de gène rapporteur toxique et dont l'expression est sous contrôle de *luxR-luxI*, est inutilisable pour la sélection de peptides inhibiteurs au sein de la banque car l'expression basale du gène toxique empêche l'obtention d'une culture de cette souche et donc une préparation de cellules compétentes DH10B [pCcdB5] que l'on pourrait transformer avec la banque de peptides. Par contre, il pourrait être intéressant de tester avec ce système des peptides potentiellement inhibiteurs isolés par ailleurs. Il faudrait pour ce faire transformer des bactéries d'abord par le plasmide encodant un peptide inhibiteur, puis par le plasmide pCcdB5. Le peptide étant produit dans les bactéries avant leur transformation par pCcdB5, pourrait diminuer le taux d'expression de *ccdB* en interagissant avec LuxR et ainsi permettre aux bactéries de survivre. Ce système sera donc utilisé de cette façon par la suite.

Pour pallier les problèmes rencontrés avec le gène rapporteur toxique *ccdB*, notre choix s'est porté sur un système rapporteur à toxicité conditionnelle, à savoir le gène *pyrF*, codant pour l'orotidine 5'-phosphate décarboxylase qui, sur un milieu contenant du 5-FOA (5-fluoroorotic acid), transforme ce composé en un dérivé toxique. La sensibilité d'une souche au 5-FOA dépend de la quantité de la protéine PyrF présente dans la souche, donc du taux d'expression du gène encodant cette protéine. Le taux basal d'expression du gène que l'on place sous le contrôle du promoteur *luxI* est,

comme nous l'avons vu pour le plasmide pCcdB5, relativement élevé. En plaçant la séquence codante du gène *pyrF* sous le contrôle du promoteur *luxI* dans ce même plasmide, la quantité de protéine PyrF produite, sans apport d'OHHL activatrice, devrait suffire à rendre une souche transformée par ce système sensible au 5-FOA. Un peptide inhibiteur de l'activité de LuxR pourrait diminuer le taux d'expression de *pyrF* et rendre la souche transformée par le système basé sur *pyrF* résistante au 5-FOA.

1.4. Clonage de la séquence codante de *pyrF*

1.4.1. Amplification PCR

La séquence codante de *pyrF* a été amplifiée par PCR au moyen des amorces *pyrF* amont et *pyrF* aval. Comme pour *ccdB*, cette amplification PCR a permis d'obtenir la séquence codante de *pyrF*, tout en permettant, grâce aux amorces, la restauration des sites de restriction *Sna*BI et *Bst*1107I après le clonage (fragment de 743 pb). Ces mêmes amorces ont aussi permis de placer l'insert *pyrF* parfaitement à la place de la séquence codante de *luxC*. Cette amplification s'est faite sur l'ADN génomique de la souche JM101, et ce dans les mêmes conditions que celles effectuées pour *ccdB*, à l'exception des amorces utilisés. Les amplicons obtenus sont, comme l'étaient ceux de *ccdB*, non phosphorylés.

1.4.2. Conditions de clonage

Pour assurer le clonage de *pyrF*, comme lors du clonage de *ccdB*, nous avons utilisé pour effectuer la ligation un large excès d'insert *pyrF* par rapport à la matrice (40 X plus en nombre). Un contrôle négatif de ligation (c'est-à-dire une ligation sans insert) a également été effectué. Les conditions de ligation sont quant à elles parfaitement identiques à celles choisies pour *ccdB*, si ce n'est la quantité de l'insert *pyrF* qui cette fois est de 14 ng (deux fois plus en quantité que pour *ccdB*, puisque la séquence de *pyrF* est environ deux fois plus longue que celle de *ccdB*).

Ces deux ligations (test et contrôle) ont été transformées dans la souche DH10B à raison de 1.25 ng d'ADN de matrice par transformation, et nous avons obtenu environ 200 colonies transformées pour chacune des transformations.

1.4.3. Recherche et obtention des clones *pyrF*

Comme c'était le cas pour *ccdB*, l'incorporation de la séquence de *pyrF* peut se faire dans les deux sens et la différenciation entre ces deux constructions plasmidiques s'effectue par PCR, en utilisant les couples d'amorces *luxI* amont et *pyrF* aval (amplification possible sur les clones « à l'endroit ») ou les couples de amorces *luxI* amont et *pyrF* amont (amplification possible sur les clones « à l'envers ») (Figure 11). Des PCR sur 45 colonies et 11 colonies différentes ont été nécessaires pour trouver les constructions présentant l'insert respectivement à l'endroit et à l'envers (Figure 12). Les deux clones ont été appelés PyrF18 (« à l'endroit ») et PyrF15 (« à l'envers »). Des préparations d'ADN plasmidique ont été faites pour ces deux clones, avec un rendement de 65 µg pour PyrF18 (midipréparation) et de 500 ng pour PyrF15 (minipréparation).

1.5. Caractérisation du système rapporteur *pyrF*

1.5.1. Le plasmide pPyrF18

Les sites de restrictions *Sna*BI et *Bst*1107I sont restaurés quand la séquence de *pyrF* est présente dans le bon sens, alors que ces sites de restriction ne sont pas reformés si la séquence de *pyrF* a été clonée à l'envers. Cette différence nous permet aussi de distinguer les deux plasmides. Des restrictions diagnostiques (*Eco*RI, *Sna*BI, *Bst*1107I, *Hind*III, et *Xba*I) ont été effectuées sur le plasmide pPyrF18 et ont confirmé que la préparation d'ADN correspond au plasmide attendu. La région du plasmide comportant l'insert *pyrF* a fait l'objet d'un séquençage au moyen des primers pSB401 amont, *luxI* amont, *pyrF* amont et *pyrF* aval (Figure 13). Ces séquences nous ont confirmé la présence de l'insert *pyrF*, dans le bon sens et à la position voulue, et que les deux sites *Sna*BI et *Bst*1107I sont reformés.

En outre, la restriction *EcoRI* sur le plasmide pPyrF18 et le séquençage nous ont montré que l'insert de 24 pb entre les deux sites *SnaBI* et contenant un site *EcoRI*, a disparu suite au clonage (cf. Figure 4).

I.5.2. Le plasmide pPyrF15

Une série de restrictions diagnostiques (*EcoRI*, *SnaBI*, *Bst1107I*, *HindIII*, et *XbaI*) a permis de valider la minipréparation d'ADN plasmidique de pPyrF15 effectuée.

I.5.3. Phénotypes associés aux plasmides pPyrF18 et pPyrF15

La souche d'*E. coli* DL101, souche auxotrophe pour l'uracile a ensuite été transformée par les plasmides pPyrF18 et pPyrF15. Le plasmide pSB401 a servi de contrôle de transformation. Etant donné que le gène *ccdB* sous le contrôle du *luxI* était suffisamment exprimé pour tuer les cellules transformées avec le plasmide pCcdB5, donc que ce gène s'exprimait à un niveau basal sans activation via une HSL, il est probable que le gène *pyrF* dans le plasmide pPyrF18 soit également exprimé à un niveau basal. Dans ce cas, la souche DL101 [pPyrF18] devrait être capable de survivre sur un milieu minimum sans uridine (composé utilisé pour combler le manque d'uracile chez les souches auxotrophes pour cette pyrimidine) alors que la souche DL101 en est incapable. Pour vérifier cette hypothèse, les souches DL101 [pPyrF18], DL101 [pPyrF15] et DL101 ont été striées sur un milieu minimum avec ou sans uridine. Ce milieu sans uridine n'apporte aux bactéries qu'une source de carbone, quelques éléments inorganiques et de la thiamine (la souche DL101 étant aussi auxotrophe pour ce composé). Comme attendu, la souche DL101 [pPyrF18] pousse sur un milieu sans uridine, bien que la croissance soit relativement lente, ce qui semble montrer que l'expression du gène *pyrF* sous le contrôle de *luxI* soit limitante. La souche DL101 quant à elle est incapable de pousser sans un apport externe d'uridine. Cette expérience nous permet de confirmer la présence de l'insert *pyrF* dans le plasmide pPyrF18 et son expression basale sans apport d'OHHL.

Contrairement à ce que l'on avait observé avec le gène *ccdB* cloné « à l'envers », à savoir qu'il ne semble pas exprimé (puisque la souche DH10B [pCcdB23] pousse), la souche DL101 [pPyrF15] arrive tout de même à pousser sur le milieu minimum sans uridine. Cependant, la croissance est bien plus lente pour cette souche qu'elle ne l'était pour la souche DL101 [pPyrF18] (près de 60 h à 37°C pour obtenir des colonies d'une taille comparable à celle obtenue après 36-48h pour DL101 [pPyrF18]). Cette différence reflète vraisemblablement une différence de sensibilité des deux tests mis en œuvre pour caractériser les deux gènes rapporteurs. L'expression de *ccdB* « à l'envers » est inférieure au seuil de toxicité de CcdB alors que l'expression de *pyrF* « à l'envers » est suffisante pour assurer une croissance lente de la souche DL101 [pPyrF15].

I.5.4. Caractérisations supplémentaires des deux systèmes

Plusieurs expériences supplémentaires ont permis de caractériser les systèmes PyrF18 et PyrF15 et plus précisément le comportement des souches DL101 [pPyrF18] et DL101 [pPyrF15] dans différentes conditions de milieu. Pour ce faire, des boîtes de milieu minimum avec différents composés supplémentaires ont été réalisées.

I.5.4.1. Uridine

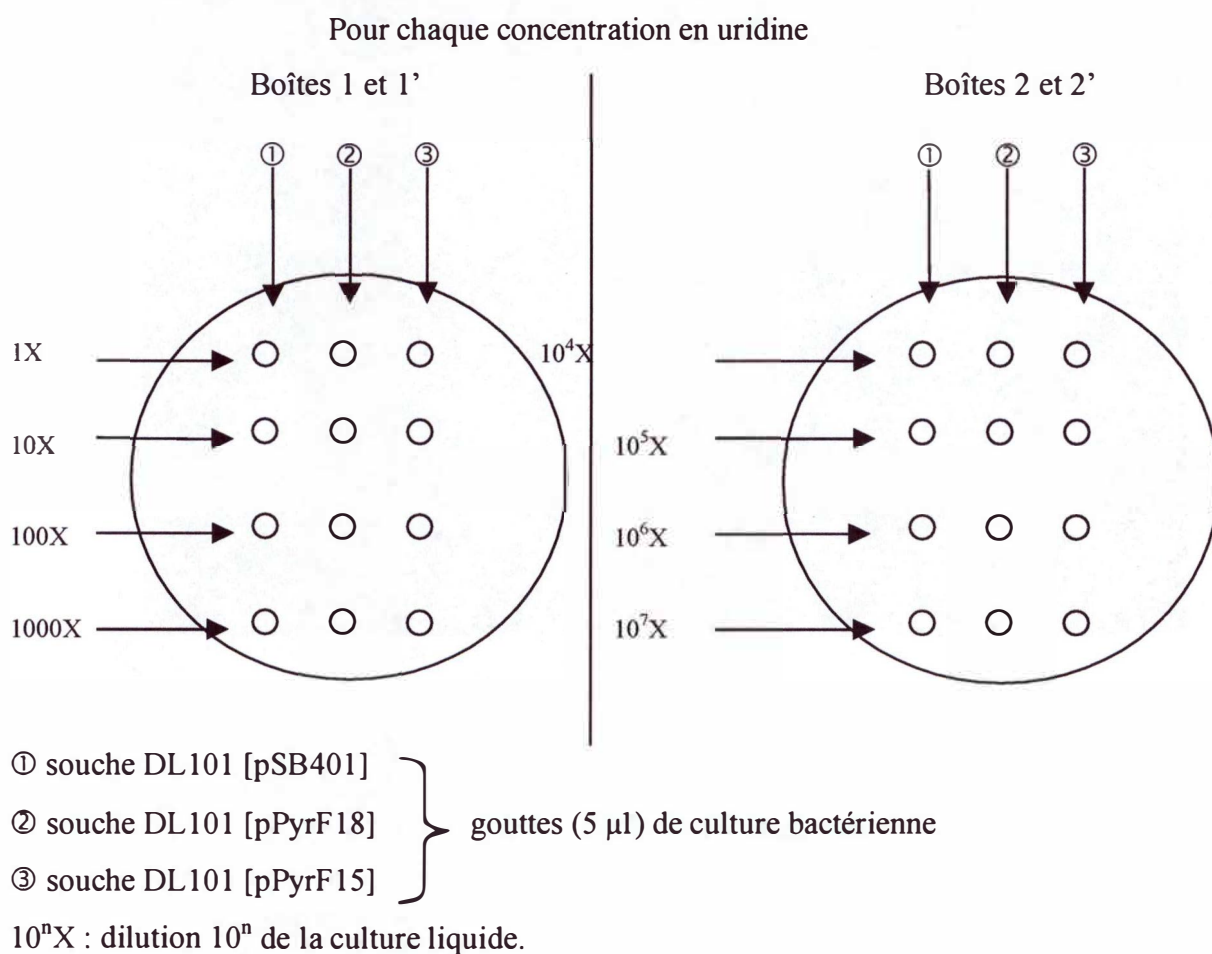
On s'attend à ce que, sur un milieu avec uridine en concentration limitante, la souche DL101 [pPyrF18] se développe plus rapidement que la souche DL101 [pPyrF15], la souche DL101 [pSB401] (contrôle négatif) poussant le plus lentement. En effet, la souche DL101 [pPyrF18] comporte la séquence *pyrF* exprimée à un taux basal sur le plasmide pPyrF18, la souche DL101 [pPyrF15] comporte la séquence *pyrF* exprimée à un taux plus faible que dans la souche DL101 [pPyrF18] et la souche DL101 [pSB401] ne comporte pas de copie fonctionnelle du gène *pyrF*.

Les milieux utilisés pour ces tests contiennent de l'uridine, composé utilisé pour combler le manque d'uracile chez les souches auxotrophes pour cette pyrimidine. Différentes concentrations en uridine ont été testées, à savoir 0,01%, 0,05%, 0,1%,

0,3% et 1%. Pour chaque concentration en uridine, quatre boîtes ont été préparées, deux boîtes pour déposer les bactéries (boîtes 1 et 2) et deux autres servant de duplicats (boîtes 1' et 2').

Les cellules ont été déposées sous forme de gouttes de cultures bactériennes de 5 μ l, et ce à différentes dilutions. Avant de déposer les gouttes sur les boîtes, les cultures bactériennes, réalisées en milieu riche (LB), ont été lavées à deux reprises avec du milieu minimum liquide sans uridine, afin d'enlever les résidus d'uracile présents dans le milieu riche.

Les boîtes se présentent comme suit :



Les différentes dilutions sont effectuées afin de voir apparaître des colonies isolées, qui nous permettent de comparer la croissance des trois souches en fonction de la concentration en uridine présente dans le milieu.

Cette manipulation nous a permis de voir que la souche DL101 [pPyrF18] pousse plus vite que les deux autres souches, et ce à n'importe quelle concentration en uridine ajoutée au milieu. Pour les plus faibles concentrations en uridine (0,01% et 0,05%), cette différence de croissance entre les trois souches est la plus marquée, c'est-à-dire que la souche DL101 [pPyrF18] se développe plus rapidement que la souche DL101 [pPyrF15] alors que la souche DL101 [pSB401] ne pousse presque pas. La concentration en uridine à laquelle la souche DL101 [pPyrF18] se développe bien est comprise entre 0,3 et 1% (Figure 14).

I.5.4.2. 5-FOA

Des boîtes identiques à celles présentées ci-dessus ont été réalisées avec différentes concentrations en 5-FOA, et une concentration en uridine fixée à 0,6%. En testant une gamme de concentrations en 5-FOA, nous espérons trouver la concentration critique en ce composé toxique pour la souche DL101 [pPyrF18]. En effet, pour la sélection de peptides inhibiteurs de LuxR, il est important d'utiliser une concentration légèrement supérieure à la concentration limite qui empêche la croissance de la souche DL101 [pPyrF18] ; de cette manière, un tout petit effet inhibiteur de LuxR apporté par un peptide devrait entraîner une diminution de l'expression de *pyrF* et donc permettre aux cellules qui portent ce peptide d'être sauvées sur un milieu avec cette concentration critique en 5-FOA. Nous pensons effectivement que le gène *pyrF*, placé sous la dépendance du promoteur *luxI* et du régulateur LuxR, s'exprime, en absence d'OHHL, grâce à l'action combinée de ces deux éléments. Or, nous recherchons un peptide inhibant l'effet du second élément (LuxR). L'effet de ce peptide ne se marquerait donc que par une diminution de l'expression de *pyrF*, et non par son extinction totale, d'où l'intérêt de se placer à une concentration suffisamment élevée en 5-FOA pour tuer les clones portant un peptide ne modifiant pas l'expression de *pyrF*, mais pas trop élevée pour laisser une chance aux bactéries dont l'expression de *pyrF* est diminuée mais non abolie d'être sélectionnées. Les tests sont toujours effectués avec les trois souches (DL101 [pPyrF18], DL101 [pPyrF15] et DL101 [pSB401]), sous forme de gouttes de 5 µl Il est également important d'ajouter suffisamment d'uridine (0,6%) pour éviter de

perdre la souche suite au manque d'uridine (dans le cas d'une diminution de l'expression de *pyrF*).

Afin de trouver la concentration en 5-FOA limite pour la souche DL101 [pPyrF18] (c'est-à-dire la concentration la plus basse en 5-FOA à laquelle la souche DL101 [pPyrF18] est sensible), trois gammes de concentrations ont été testées :

- Une première série de concentrations en 5-FOA allant de 100 mg/l à 2 g/l
- Ensuite une deuxième série de concentrations allant de 50 mg/l à 500 mg/l
- Et une troisième série allant de 1 à 50 mg/l

Cette dernière gamme nous a permis de trouver la concentration limite en 5-FOA pour la souche DL101 [pPyrF18] ; cette concentration étant comprise entre 5 et 10 mg/l. La figure 15 représente la photographie d'une boîte de milieu minimum contenant une concentration de 50 mg/l de 5-FOA sur laquelle les trois souches ont été déposées, et où l'on voit clairement que les souches DL101 [pSB401] et DL101 [pPyrF15] poussent, alors que la souche DL101 [pPyrF18] ne se développe plus.

Nous avons ensuite évalué l'utilisation de cette concentration en 5-FOA dans les conditions dans lesquelles nous allons sélectionner des peptides au sein de la banque. En effet, les cellules DL101 [pPyrF18] transformées par la banque de peptides seront déposées sur un milieu minimum (M9) avec de l'uridine et du 5-FOA, non pas sous forme de goutte, mais sous forme d'un tapis cellulaire au sein duquel la croissance des bactéries ayant un peptide d'intérêt (inhibant la production de PyrF) devrait être favorisée. Il est intéressant de savoir comment un tapis de bactéries DL101 [pPyrF18] réagirait face à cette concentration limite en 5-FOA, puisque ce composé est consommé mais pas régénéré. Pour mimer les conditions de sélection, nous avons réalisé des mélanges de cultures des souches DL101 [pPyrF18] (souche dans laquelle sera transformée la banque de peptides et qui ne doit pas pousser sur la concentration choisie en 5-FOA) et une souche qui va se comporter comme des clones d'intérêt, c'est-à-dire qui produira moins de protéine PyrF. Nous avons donc pris comme seconde souche pour ce test la souche DL101 transformée par le plasmide pSB401. Dans ces conditions, le mélange de bactéries déposé sur des boîtes avec du 5-FOA devrait se comporter de la façon suivante :

- La souche DL101 [pPyrF18] ne pourra croître, comme le fera le tapis bactérien transformé par les peptides non-inhibiteurs.
- La souche DL101 [pSB401] survivra (car elle ne comporte pas de copie fonctionnelle du gène *pyrF*), comme le feront les bactéries transformées par les peptides inhibiteurs.

Ces mélanges de cellules ont été préparés à partir de cultures faites dans du milieu riche (LB) ; ces cultures ont été lavées deux fois dans un milieu minimum pour rester dans les mêmes conditions que lors des premières mises au point. Les cultures bactériennes des deux souches (DL101 [pPyrF18] et DL101 [pSB401]) ont été diluées après les lavages de façon à obtenir une densité optique à 550 nm de 0.1, ce qui permet d'évaluer la quantité de cellules à 3×10^6 cellules/100 μ l de culture.

Trois étalements différents de bactéries ont été effectués :

- 100 μ l de culture de la souche DL101 [pPyrF18] (équivalent à 3×10^6 cellules qui devraient mourir)
- 99 μ l de culture de la souche DL101 [pPyrF18] (équivalent à 3×10^6 cellules qui devraient mourir) + 1 μ l de culture de la souche DL101 [pSB401] diluée 100 X (équivalent à 3×10^3 cellules qui devraient survivre)
- 99 μ l de culture de la souche DL101 [pPyrF18] (équivalent à 3×10^6 cellules qui devraient mourir) + 1 μ l de culture de la souche DL101 [pSB401] diluée 10^4 X (équivalent à 30 cellules qui devraient survivre)

Une première gamme de concentrations en 5-FOA (50 mg/l ; 10 mg/l ; 5 mg/l ; 1 mg/l et 0 mg/l) a été testée et il semble que le tapis de bactéries DL101 [pPyrF18] soit encore trop peu sensible au 5-FOA, même à une concentration de 50mg/l. Une deuxième gamme de concentrations en 5-FOA a donc été testée (10 mg/l ; 20 mg/l ; 40 mg/l ; 80 mg/l ; 160 mg/l et 0 mg/l), en y déposant les mélanges de souches de la même façon que pour la gamme précédente. Les concentrations en 5-FOA de 80 mg/l et 160 mg/l inhibent fortement la croissance de la souche DL101 [pPyrF18].

Suite à toutes ces manipulations, nous avons conclu que les tests de croissance sur 5-FOA sont dépendant de la quantité de bactéries étalées sur boîte de Pétri. Puisque la souche DL101 [pPyrF18] ne se développait que difficilement sur une concentration comprise entre 80 et 160 mg/l de 5-FOA, et en tout cas beaucoup moins vite que la souche DL101 [pSB401], nous avons choisi une concentration en 5-FOA de 100 mg/l pour effectuer la sélection des peptides au sein de la banque. Les bactéries exprimant des peptides inhibiteurs potentiels devraient, à cette concentration, pousser plus vite que les autres.

II. Sélection de peptides inhibiteurs au sein de la banque de peptides

La banque de peptides utilisée au cours de ce mémoire est celle construite par l'équipe de Lenstra (Lenstra *et al.*, 1992) et est décrite dans le chapitre Introduction.

II.1. Conditions de la sélection

Suite aux différentes mises au point et caractérisations effectuées sur la souche DL101 [pPyrF18], les conditions dans lesquelles la sélection des peptides au sein de la banque ont pu être déterminées.

La banque possède une diversité de l'ordre de 10^7 et de façon à représenter au moins une fois la diversité de la banque, c'est-à-dire au moins une fois chaque peptide potentiel, nous devons obtenir au moins 6×10^7 bactéries DL101 [pPyrF18] transformées par la banque. Afin d'évaluer la quantité de plasmide de la banque à utiliser, nous avons donc testé la compétence de cellules électrocompétentes DL101 [pPyrF18]. La colonie DL101 [pPyrF18] qui a été striée sur le milieu minimum a été mise en culture et des cellules électrocompétentes ont été préparées à partir de cette culture. Ensuite, ces cellules ont été transformées par 50 ng d'ADN de la banque, et la compétence des bactéries a été évaluée à 3×10^8 transformants par μg d'ADN. Etant donné qu'il faut obtenir au moins 6×10^7 cellules transformées par la banque, il nous faut transformer la souche DL101 [pPyrF18] avec au moins 200 ng d'ADN. Afin de

s'assurer d'atteindre ce nombre de 6×10^7 transformants, nous avons réalisé trois transformations, chacune avec 200 ng d'ADN de la banque.

Les conditions de la sélection sont les suivantes :

- Chacune des trois transformations a été étalée sur 10 boîtes de milieu (diamètre de 90 mm), de façon à avoir l'équivalent de 6×10^6 transformants par boîte, ce qui correspond approximativement au nombre de bactéries déposées sur une boîte de milieu pour les tests de mise au point sur milieu sélectif.
- Le milieu est constitué de M9 + Thiamine + Uridine 64mg/l + Cat 100µg/ml + Tc 12,5 µg/ml + Amp 100µg/ml + 5-FOA 100 mg/l.

II.2. Résultats de la sélection

Nous avons obtenu un total d'environ $5,5 \times 10^8$ transformants pour les trois transformations, ce qui représente à peu près dix fois la diversité de la banque. Cette efficacité a été évaluée en déposant une petite partie des trois transformations (1µl sur 1 ml de chaque transformation) sur un milieu riche (LB) avec les trois antibiotiques (chloramphénicol, tétracycline et ampicilline). Parmi ces transformants, 1000 à 1500 colonies se sont développées beaucoup plus rapidement que le tapis bactérien. Ces 1000 à 1500 clones constituent des candidats potentiels car ils sont capables d'inhiber le phénotype associé à l'expression de *pyrF*. Les bactéries du tapis qui poussaient plus lentement se sont avérées être mortes; ceci a été montré en restreignant un fragment du tapis sur un milieu complet, aucune bactérie n'ayant pu reprendre sa croissance sur ce milieu.

II.3. Traitement des candidats

Les différentes étapes qui vont suivre sont reprises à la figure 16. Les lettres indiquées entre parenthèses se rapportent à cette figure.

Parmi les 1000 à 1500 colonies sélectionnées (A), 45 ont été choisies selon leur taille (les plus grosses colonies étant choisies de préférence puisque les bactéries constituant ces colonies produisent vraisemblablement moins de protéines PyrF et sont donc moins sensibles à l'effet toxique du 5-FOA). Ces 45 colonies ont été restreintes sur un milieu identique à celui utilisé lors de la sélection (B). Ces stries permettent d'éventuellement confirmer la résistance au 5-FOA des colonies choisies. 40 des 45 colonies ont repris leur croissance sur ce milieu et 15 de ces clones ont été choisis au hasard pour les tests ultérieurs (B) (Ces 15 clones portent les numéros 3, 5, 8, 12, 16, 18, 21, 23, 30, 31, 33, 36, 41, 42, 43).

Ces 15 clones ont été mis en culture dans du milieu riche (LB). Ces 15 cultures ont ensuite fait l'objet d'une minipréparation d'ADN plasmidique (C), de façon à récupérer les deux plasmides que contiennent les clones, à savoir le plasmide comportant la séquence du peptide et le plasmide ayant servi de système rapporteur (pPyrF18). Pour effectuer les tests qui vont nous permettre de montrer si les peptides sélectionnés inhibent l'expression du gène placé sous la dépendance du promoteur *luxI* et du régulateur LuxR, un contrôle négatif est nécessaire. Nous avons pris comme contrôle un peptide de la banque choisi au hasard, plus précisément un des clones ayant poussé sur les boîtes de milieu riche (LB) (boîtes qui ont permis de mesurer l'efficacité de transformation de la souche DL101 [pPyrF18] par la banque de peptides). Ce clone a été mis en culture et a fait l'objet d'une minipréparation d'ADN.

Suite aux résultats de la sélection des peptides de la banque, diverses hypothèses peuvent expliquer la résistance au 5-FOA observée : soit une mutation dans la séquence de *pyrF* ou dans le plasmide portant cette séquence (pPyrF18) induisant une diminution de l'expression ou de l'activité de PyrF, soit l'effet d'un peptide diminuant l'effet toxique du 5-FOA, en inhibant par exemple l'expression de *pyrF* (c'est-à-dire en inhibant l'effet activateur de LuxR, c'est-à-dire l'effet recherché), ou encore inhibant directement l'activité de la protéine PyrF. Afin de vérifier si l'effet sur la croissance sur milieu sélectif est dû à la présence du peptide, les 13 plasmides portant la séquence des peptides (plasmides-peptide) seront dans un premier temps récupérés

et ensuite testés avec d'autres systèmes rapporteurs basés sur d'autres gènes rapporteurs que *pyrF*, mais toujours sous la dépendance de *luxI* et de LuxR.

Pour ce faire, nous avons transformé des bactéries *E. coli* DH10B par les 15 préparations d'ADN plasmidiques (D), et chacune de ces 15 transformations ont été déposées à la fois sur un milieu riche avec ampicilline, milieu sélectionnant les bactéries transformées par un plasmide portant la séquence d'un peptide, et sur un milieu riche (LB) avec tétracycline, milieu sélectionnant les bactéries transformées par le plasmide pPyrF18. Il fallait, à ce moment, s'assurer que les 15 transformants, correspondant aux 15 clones initiaux choisis, ne comportent qu'un seul des deux plasmides (pPyrF18 et plasmide- peptide) ; en effet, puisque les transformations ont été effectuées à partir des préparations d'ADN contenant les deux plasmides, il existe un risque infime qu'une bactérie ait été transformée par les deux plasmides conjointement. Dans ce cas, la bactérie sera résistante aux deux antibiotiques (ampicilline et tétracycline). Pour vérifier cette éventualité, nous avons repiqué une colonie de chacune des 30 boîtes sur 3 variantes du milieu (avec ampicilline, avec tétracycline et avec les deux antibiotiques) (E). Un contrôle (DH10B [pSB401]) a également été repiqué sur ces trois milieux. En théorie, les 15 souches DH10B [peptide] ne doivent pousser que sur le milieu contenant de l'ampicilline, les 15 souches DH10B [pPyrF18] ne doivent pousser que sur le deuxième milieu, ainsi que le contrôle DH10B [pSB401], et aucun clone ne doit se développer sur le milieu contenant les deux antibiotiques. Il s'est avéré que les clones DH10B [peptide 8], DH10B [peptide 16] et DH10B-[pPyrF18-36] ont poussé sur les trois milieux, ce qui signifie que ces 3 transformants comportaient les deux plasmides différents provenant d'un même clone initial. Nous avons donc continué la caractérisation des 27 autres transformants pour lesquels nous étions sûr de n'avoir qu'un seul des deux plasmides (F).

Chacun de ces 27 transformants a été mis en culture et a fait l'objet d'une minipréparation d'ADN, de façon à pouvoir récupérer les 13 plasmides-peptide et les 14 plasmides pPyrF18 (G). Pour vérifier que ces plasmides comportent bien la séquence d'un peptide, une amplification PCR a été effectuée sur les 13 préparations d'ADN grâce aux amorces B.Q.Lenstra amont et B.Q.Lenstra aval. Une amplification

PCR, au moyen des amorces *luxI* amont et *pyrF* aval, a également été effectuée sur les 14 préparations d'ADN contenant le plasmide pPyrF18 de façon à s'assurer que les plasmides isolés comportent toujours la séquence codante de *pyrF*. Toutes les amplifications PCR ont donné le résultat escompté, à savoir l'amplification d'un fragment d'ADN de 236 pb pour les plasmides peptides et un fragment de 868 pb (H). Les 13 plasmides ont ensuite été transformés dans les souches, (I) DH10B [pCcdB5], (J) DH10B [pSB401] et (K) DH10B [pPyrF18]. Les systèmes rapporteurs pCcdB5, pSB401 et pPyrF18 vont nous permettre de vérifier si les peptides inhibent l'expression des gènes placés sous la dépendance du promoteur *luxI* et du régulateur LuxR. Les tests effectués avec ces trois systèmes rapporteurs sont détaillés au point suivant.

III. Caractérisations des clones

Rappelons que ce que nous recherchons, ce sont des peptides inhibiteurs de l'activité régulatrice de la protéine LuxR. Non seulement, la résistance au 5-FOA présentée par les 15 candidats choisis peut être due à une mutation dans le plasmide pPyrF18, mais si ce n'est pas le cas, les peptides peuvent induire la résistance au 5-FOA en inhibant un autre élément que LuxR (activité de PyrF, ...).

Les transformations bactériennes par les différents plasmides isolés vont nous permettre de :

1. montrer que les peptides d'intérêt sont capables de restaurer le phénotype de résistance au 5-FOA.
2. tester l'activité des peptides dans d'autres systèmes que celui utilisé lors de la sélection des peptides afin de sélectionner les peptides dont l'effet ne se fait pas sur PyrF.

III.1. Système rapporteur pCcdB5

Afin de pallier les problèmes rencontrés lors de la mise au point de ce système (voir point I.3), à savoir que les cellules d'une souche sensible à l'effet toxique de CcdB, transformées avec le plasmide rapporteur pCcdB5 (plasmide

comportant la séquence codante de *ccdB* placée sous le contrôle du promoteur *luxI*), sont incapables de survivre, nous avons transformé la souche DH10B d'abord avec les 13 plasmides porteurs d'un peptide candidat, et ensuite avec le plasmide pCcdB5, de façon à permettre aux peptides de jouer leur rôle inhibiteur et d'ainsi permettre la croissance de la souche transformée par pCcdB5.

Nous avons obtenu des transformants pour chacune des 13 transformations avec les plasmides encodant les peptides. Ensuite, des cellules compétentes ont été préparées à partir de ces 13 souches DH10B [peptide], et ces cellules ont été transformées avec le plasmide pCcdB5. Ces 13 transformations ont été déposées sur un milieu riche sélectif. Les souches DH10B et DH10B [peptide négatif] ont également été transformées avec le plasmide pCcdB5.

Aucun transformant n'a été obtenu pour ces 15 transformations (la souche DH10B, la souche DH10B [peptide négatif] et les 13 souches DH10B [peptide] transformées par pCcdB5). Il est à noter que la compétence des cellules n'a pas été mesurée et ce pour des raisons techniques. En effet, toutes les caractérisations effectuées sur les clones candidats ont nécessité plus de 60 transformations bactériennes. Nous ne pouvons donc pas certifier que les 15 souches ont été transformées par le plasmide pCcdB5, toutefois, toutes les cellules compétentes utilisées lors de ces 60 transformations ont été préparées en même temps et avec la même méthode (cellules TSB compétentes détaillées dans le chapitre Matériel et méthodes). Il est donc peu probable que ces seules 15 transformations bactériennes aient échoué alors que la plupart des autres transformations ont fonctionné comme attendu.

Le fait qu'aucune bactérie portant un plasmide candidat et cotransformée par le plasmide pCcdB5 n'ait poussé, ne nous permet pas de dire que nos 13 peptides candidats n'inhibent pas LuxR. En effet, nous pensons que le taux de transcription basal du gène placé sous le contrôle du promoteur *luxI* et du régulateur LuxR est engendré par les effets additionnels de l'activité basale de *luxI* et de l'expression basale de *luxR*. Peut-être que l'inhibition de l'activité de l'un de ces deux éléments (LuxR dans notre cas) ne diminue pas suffisamment le taux de transcription de *ccdB*, et donc ne permet pas aux cellules de survivre.

III.2. Système rapporteur pSB401

Le système rapporteur pPyrF18 a permis de sélectionner des peptides au sein de la banque, apportant aux bactéries transformées une résistance au 5-FOA. Cependant, ce système ne nous permet pas d'évaluer l'effet inhibiteur de ces peptides, puisque le plasmide pPyrF18 ne constitue pas un système rapporteur « dosable ». Par contre, le système rapporteur pSB401 devrait nous permettre de montrer l'effet inhibiteur d'un peptide sur l'expression des gènes de luminescence, en montrant une diminution, voire une extinction de la production de bioluminescence. Pour effectuer ces tests, la souche DH10B [pSB401] a donc été transformée par les 13 plasmides-peptide. La transcription basale des gènes de luminescence portés par le plasmide pSB401 ne permet qu'une faible production de lumière. Ces tests de luminescence ont donc été effectués en présence d'OHHL, de façon à activer LuxR. Les peptides candidats doivent donc entrer en compétition avec l'HSL spécifique de LuxR (OHHL ou *N*-3-oxohexanoyl homosérine lactone). Leur effet, s'il existe, sera sans doute alors beaucoup moins marqué que lors de la sélection. Ces tests de luminescence ont été effectués en culture liquide.

Pour effectuer ces tests de luminescence, nos 13 clones candidats DH10B [pSB401] [plasmide-peptide] ont été mis en culture. Deux autres souches, DH10B [pPyrF18] et DH10B [pSB401] transformées par le plasmide portant la séquence du peptide négatif, ont également été mises en culture, ces clones nous servant respectivement de contrôles négatif et positif. Pour chacun de ces 15 clones, deux cultures distinctes ont été réalisées, chacune à partir d'une colonie isolée différente. Différentes quantités d'OHHL ont été testées, de 4 à 0,0064 ng (dilutions de 5 en 5) ainsi que 0 ng comme contrôle négatif. Des mesures de luminescence ont été prises après 1 heure et 3 heures d'incubation (Tableau 1). Les résultats montrent que deux peptides (12 et 36) inhibent la quantité de luminescence produite au cours du temps par les bactéries possédant ces peptides (Figure 17). Le fait que deux cultures indépendantes d'un même clone (12.1, 12.2 ou 36.1, 36.2) donnent le même résultat nous indique que c'est bien le peptide

qui provoque cette diminution de production de luminescence, et non une variation expérimentale non contrôlée.

III.3. Système rapporteur pPyrF18

Afin de vérifier que les phénotypes observés lors des tests de luminescence sont bien dus à l'action des peptides 12 et 36, nous avons voulu vérifier que le phénotype de résistance au 5-FOA en présence de ces deux peptides pouvait être restauré dans la souche DL101 [pPyrF18]. Pour ce faire, nous avons transformé cette souche, utilisée lors de la sélection, par les deux plasmides encodant les peptides 12 et 36. Ensuite, un transformant pour chacun de ces deux clones a été strié sur le même milieu que celui utilisé lors de la sélection (milieu minimum M9 + Uridine 64mg/l + 5-FOA 100 mg/l). Trois autres clones ont également été striés comme contrôles sur ce milieu: DL101 [pPyrF18] [peptide 5] (un des 15 clones sélectionnés), DL101 [pPyrF18] [peptide négatif] (pris au hasard dans la banque) et DL101 [pSB401] [peptide négatif].

Si les deux peptides inhibent bien l'activité régulatrice de LuxR (comme nous pouvions le penser suite aux tests de luminescence), les deux souches DL101 [pPyrF18] [peptide 12] et DL101 [pPyrF18] [peptide 36] doivent pouvoir se développer sur ce milieu. La souche DL101 [pSB401] [peptide négatif] sert de contrôle positif de croissance dans ce test et la souche DL101 [pPyrF18] [peptide négatif] sert de contrôle négatif de croissance. Il s'avère que les deux souches portant les séquences des peptides 12 et 36 se développent bien sur ce milieu, même si les colonies sont un peu plus petites que celles de la souche DL101 [pSB401] [peptide négatif] servant de contrôle positif de croissance. Le contrôle négatif ne montre pas de croissance, comme attendu. Il semble donc bien que les deux peptides (12 et 36) inhibent l'expression de *pyrF* dans le système pPyrF18. Le peptide 5 isolé lors de la sélection initiale sur 5-FOA mais n'ayant pas montré d'activité inhibitrice de luxR dans le test de bioluminescence n'induit pas la résistance au 5-FOA de la souche DL101 [pPyrF18] dans ce test.

III.4. Séquençage des peptides

Les clones peptide-12, peptide-36, et peptide-négatif ont fait l'objet d'un séquençage. Les séquences présentées ci-dessous nous montrent que les peptides 12 et 36 sont identiques et que le quatrième codon de ces peptides est un codon stop. La séquence du peptide négatif possède également un codon stop.

Séquences nucléotidiques encodant les 3 peptides (en gras) fusionnées à la séquence de la protéine hybride *cro*- β -galactosidase d'*E. coli* :

- Clone 12 : *cro*- β -gal.-AATTCCCCGGGT**CGAGGTGAATAAGAATACGTGCAG**
- Clone 36 : *cro*- β -gal.-AATTCCCCGGGT**CGAGGTGAATAAGAATACGTGCAG**
- Clone négatif : *cro*- β -gal.-AATTCCCCGGGT**GTTATCTAACACTATCCAGGTTTG**

Séquences peptidiques (code 1 lettre) des 3 peptides (en gras) fusionnées à la séquence de la protéine hybride *cro*- β -galactosidase d'*E. coli* :

- Clone 12 : *cro*- β -galactosidase-N S P G **R G E** * (E Y V Q)
- Clone 36 : *cro*- β -galactosidase-N S P G **R G E** * (E Y V Q)
- Clone négatif : *cro*- β -galactosidase-N S P G **V I** * (H Y P G L)

Le fait que les trois séquences encodant les peptides 12, 36 et négatif choisies pour le séquençage présentent un codon stop est tout à fait plausible, sachant que les peptides aléatoires de la banque sont encodées par la séquence nucléotidique (N)₂₃. En effet, les chances d'obtenir un codon stop pour chacun des acides aminés constitutifs du peptide sélectionné sont de 3 chances sur 64 (3 codons stop pour les 64 codons possibles). De plus, les peptides aléatoires sont fusionnés à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine hybride *cro*- β -galactosidase et la présence d'un codon stop dans la séquence d'un peptide n'empêche pas la production de la protéine hybride.

Par contre, le fait que les deux peptides sélectionnés indépendamment l'un de l'autre sur base du même phénotype (résistance au 5-FOA) aient la même séquence est particulièrement intéressant et renforce l'idée que cette séquence peptidique inhibe, de quelque façon que ce soit, les activités du régulateur transcriptionnel LuxR sur le promoteur *luxI*. La mise au point d'un système de détection d'interactions nous permettrait de connaître la cible de ce peptide.

Conclusions et perspectives

La sélection de peptides inhibiteurs de l'activité de LuxR au sein d'une banque de peptides aptamères n'étant possible qu'avec un système rapporteur apportant un phénotype sélectionnable, une première construction plasmidique a été réalisée. Celle-ci consistait à remplacer les séquences codantes *luxCDABE* du plasmide pSB401 par la séquence codante du gène toxique *ccdB*, de façon à placer ce gène sous le contrôle du promoteur *luxI*. De cette façon, LuxR activera la transcription de *ccdB* en présence d'HSL inductrice. Deux plasmides ont été obtenus, le plasmide pCcdB5 comportant la séquence codante *ccdB* sous le contrôle de *luxI* (insertion de cette séquence à « l'endroit ») et le plasmide pCcdB23 comportant la séquence codante de *ccdB* dans l'autre sens (insertion de cette séquence « à l'envers »). Le taux d'expression de *ccdB* dans le plasmide pCcdB5, en absence d'OHHL, est suffisamment élevé pour tuer les bactéries porteuses de ce plasmide (souche DH10B [pCcdB5]), ce qui nous a empêché d'obtenir une culture de cette souche.

Vu l'impossibilité de mettre en œuvre ce premier système rapporteur, nous avons développé un système à toxicité conditionnelle, basé sur le gène *pyrF* dont le produit génique transforme le 5-FOA en un composé toxique. La sensibilité d'une souche au 5-FOA dépend de la quantité de la protéine PyrF présente dans la souche et donc du taux d'expression du gène *pyrF*. La séquence codante de ce gène a donc été placée sous le contrôle de *luxI* de la même façon que pour *ccdB*. Deux plasmides ont été obtenus : le plasmide pPyrF18 comportant la séquence codante de *pyrF* sous le contrôle de *luxI* (insertion de cette séquence à « l'endroit ») et le plasmide pPyrF15 comportant la séquence codante de *pyrF* « à l'envers ». La souche DL101 [pPyrF18] (DL101 étant *pyrF*- et donc auxotrophe pour l'uracile) déposée sur un milieu

minimum contenant de l'uridine est capable de se développer, alors que la même souche déposée sur un milieu minimum contenant de l'uridine (0,6%) et du 5-FOA (100 mg/l) meurt. Cette observation démontre que *pyrF* placé sous le contrôle de *luxI* est exprimé sans apport d'OHHL et renforce l'hypothèse de l'expression basale de *ccdB* sous le contrôle du même promoteur dans le plasmide pCcdB5.

En transformant la souche DL101 [pPyrF18] par une banque de peptides aptamères, des peptides inhibiteurs de l'activité de LuxR devraient permettre de diminuer le taux d'expression de *pyrF* et donc de rendre la souche DL101 [pPyrF18] [peptide inhibiteur] résistante à l'effet toxique du 5-FOA. Ce système rapporteur est donc bien fonctionnel pour sélectionner des peptides inhibiteurs de LuxR et ne nécessite pas d'apport d'OHHL pour induire l'expression de *pyrF*. La souche DL101 [pPyrF18] a été transformée par la banque de peptides aptamères et 1000 à 1500 clones ont poussé sur un milieu contenant du 5-FOA. 15 clones résistants au 5-FOA ont été choisis pour la suite des tests. Treize des 15 peptides inhibiteurs potentiels de l'activité de LuxR ont été isolés et testés avec deux autres systèmes rapporteurs, l'un basé sur le gène toxique *ccdB* (pCcdB5) et l'autre basé sur la bioluminescence (pSB401).

Pour le système rapporteur pCcdB5, la souche DH10B a d'abord été transformée par les plasmides portant la séquence des peptides candidats, puis par le plasmide pCcdB5. Aucun de ces transformants n'a survécu. Ce résultat ne nous permet pas de dire que nos 13 peptides n'inhibent pas LuxR. En effet, le taux de transcription basal de *ccdB* placé sous le contrôle du promoteur *luxI* et du régulateur LuxR est engendré par les effets additionnels de l'activité basale de *luxI* et de l'expression basale de *luxR*. Une inhibition partielle de l'activité de LuxR ne diminue peut-être pas suffisamment le taux de transcription basale de *ccdB* pour permettre aux cellules de survivre.

Un moyen de vérifier cette hypothèse serait de retirer l'insert LuxR-*luxI* du plasmide pCcdB5 et de venir y cloner le promoteur *luxI* seul. La souche DH10B transformée par cette construction plasmidique devrait, selon notre hypothèse, encore permettre une expression suffisamment élevée de CcdB pour tuer les cellules. Cette manipulation aurait permis d'affirmer qu'il était impossible de montrer l'effet inhibiteur sur LuxR d'un peptide avec le système pCcdB5, mais elle n'a malheureusement pas pu être effectuée dans le cadre de ce mémoire.

Le deuxième système rapporteur, basé sur la bioluminescence (pSB401), nous a permis de montrer que deux peptides, les peptides 12 et 36, inhibent la production de bioluminescence en présence d'OHHL. Ces deux peptides ont également été testés avec le système rapporteur pPyrF18 et ont permis de restaurer le phénotype résistant au 5-FOA.

Au vue des différents tests effectués, les peptides 12 et 36 semblent inhiber l'expression des gènes placés sous le contrôle de *luxI*. Après le séquençage nucléotidique des peptides 12 et 36, ceux-ci se sont avérés être de séquences identiques, bien que sélectionnés indépendamment l'un de l'autre. Ces deux peptides comportent dans leur séquence codante un codon stop en quatrième position. Leur séquence peptidique se résume donc à une arginine suivie d'une glycine et d'un glutamate, soit un peptide de trois acides aminés dont la structure montre des similitudes structurales avec l'OHHL.

Il serait intéressant de vérifier l'interaction entre ce peptide aptamère et LuxR au moyen d'un test totalement différent de celui que nous avons mis en œuvre, par exemple un test double-hybride (Blum *et al.*, 2000) ou par la technique de co-immunoprécipitation qui pourrait nous apporter des informations sur la cible spécifique de notre peptide. Outre ces tests, l'utilisation d'un système biosenseur (BiaCore) nous permettrait d'évaluer la force de l'interaction entre le peptide aptamère et luxR et d'évaluer cette interaction en présence de l'OHHL. L'idée de placer la séquence des peptides et la séquence de LuxR sous le contrôle de promoteurs régulables, de façon à accentuer ou inverser les phénotypes apportés par l'effet inhibiteur du peptide sur sa cible, pourrait également nous apporter de plus amples informations sur la cible et le mode de fonctionnement du peptide inhibiteur sélectionné. De même, rappelons que seulement 15 clones ont été traités au cours de ce mémoire, ce qui ne représente qu'un centième de l'ensemble des clones sélectionnés.

Nous pourrions également vérifier si la séquence peptidique sélectionnée a un effet sur d'autres protéines régulatrices intervenant dans le Quorum Sensing (homologues de LuxR) d'autres espèces bactériennes. Un peptide inhibiteur à large spectre, c'est-à-

dire inhibant plusieurs régulateurs transcriptionnels du Quorum Sensing dans notre cas, aurait en effet un intérêt particulier dans le domaine médical.

Nous avons montré dans notre travail que grâce à l'utilisation du système rapporteur basé sur le gène *pyrF* placé sous contrôle d'un couple promoteur-régulateur d'intérêt, il est possible d'identifier des peptides aptamères capables d'inhiber l'expression de ce gène rapporteur. Ce système utilisé dans le cadre de ce mémoire pour isoler des peptides inhibiteurs du couple LuxR-*luxI*, utilisé comme modèle, pourrait être exploité pour isoler des peptides aptamères inhibant d'autres régulateurs transcriptionnels.

Matériel et méthodes

I. Souches bactériennes et plasmides

I.1. Souches bactériennes

I.1.1. *E. coli* DH10B

Cette souche est utilisée pour la transformation par divers plasmides ou produits de ligation. Son génotype est le suivant :

F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX*74 *deoR* *recA1* *endA1* *araD*139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK* λ *rpsL* *nupG*.

I.1.2. *E. coli* JM101

Souche bactérienne dont l'ADN génomique a été utilisé pour les amplifications PCR des séquences codantes de *ccdB* et *pyrF*. Son génotype est le suivant :

supE *thi* Δ (*lac-proAB*) [F⁺ *traD*36 *proAB* *lacI*^qZM15].

I.1.3. *E. coli* DB3.1

Souche comprenant l'allèle *gyrA*462 qui la rend résistante à l'effet toxique de CcdB. Son génotype est le suivant :

F⁻ *gyrA*462 *endA* Δ (*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsd*20(*rB*⁻,*mB*⁻) *supE*44 *ara*14 *galK*2 *lacY*1 *proA*2 *rpsL* λ *leu* *mtl*1.

I.1.4. *E. coli* DL101

Souche bactérienne, dérivée de JM101, double mutante *ksgA*⁻ *pyrF*⁻. Son génotype est le suivant :

supE *thi* Δ (*lac-proAB*) [F⁺ *traD*36 *proAB* *lacI*^qZM Δ 15] *ksgA*⁻ *pyrF*⁻

I.1.5. *E. coli* JM109

Souche qui comportait le plasmide pSB401 lors de la minipréparation de ce plasmide. Son génotype est le suivant :

endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZMΔ15]

I.2. Plasmides

I.2.1. pSB384

Ce plasmide, représenté à la figure 1, comprend les séquences des gènes de luminescence (*luxCDABE*), l'origine de réplication P15A et le gène de résistance à la tétracycline(TC^r).

I.2.2. pSB401

Ce plasmide, représenté à la figure 2, comprend les séquences des gènes de luminescence (*luxCDABE*) placé sous le contrôle du promoteur *luxI*, la séquence du gène *luxR* sous le contrôle du promoteur *luxR*, l'origine de réplication P15A et le gène de résistance à la tétracycline(TC^r).

I.2.3. pCcdB5

Ce plasmide, représenté à la figure 3, comprend la séquence codante du gène *ccdB*, encadrée par les sites de restriction SnaBI et BstI 107I, placée sous le contrôle du promoteur *luxI*, la séquence du gène *luxR*, l'origine de réplication P15A et le gène de résistance à la tétracycline(TC^r).

I.2.4. pCcdB23

Ce plasmide, représenté à la figure 4, comprend la séquence codante du gène *ccdB* insérée dans le sens opposé à celui obtenu dans le plasmide pCcdB5, la séquence du gène *luxR*, l'origine de réplication P15A et le gène de résistance à la tétracycline(TC^r).

I.2.5. pPyrF18

Ce plasmide, représenté à la figure 5, comprend la séquence codante du gène *pyrF*, encadrée par les sites de restriction SnaBI et BstI 107I, placée sous le contrôle du promoteur *luxI*, la séquence du gène *luxR*, l'origine de réplication P15A et le gène de résistance à la tétracycline(TC^r).

I.2.6. pPyrF15

Ce plasmide, représenté à la figure 6, comprend la séquence codante du gène *pyrF* insérée dans le sens opposé à celui obtenu dans le plasmide pPyrF18, la séquence du gène *luxR*, l'origine de réplication P15A et le gène de résistance à la tétracycline(TC^r).

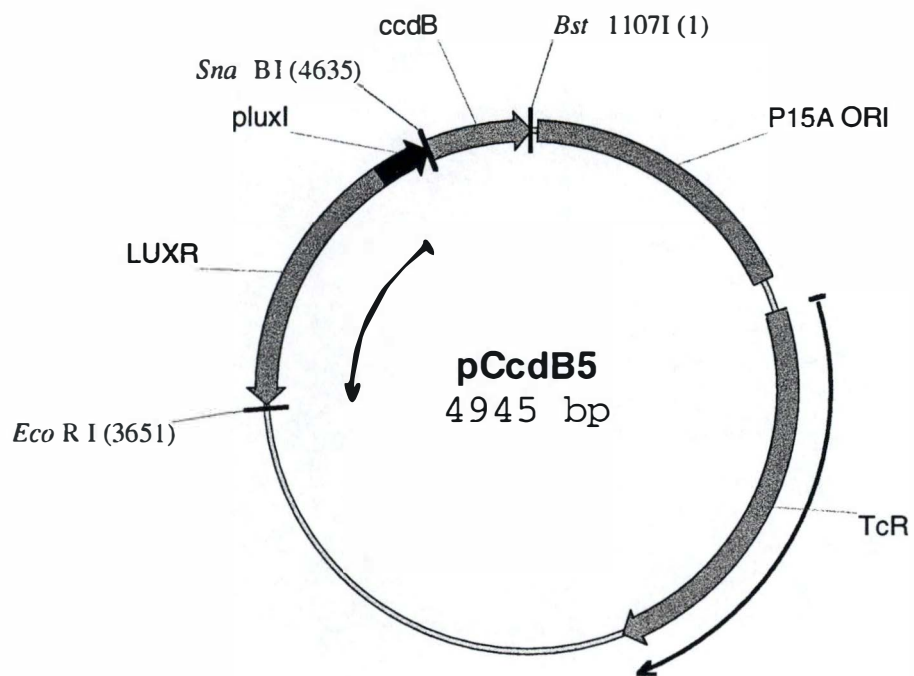


Figure 3 : Représentation du plasmide pCcdB5.

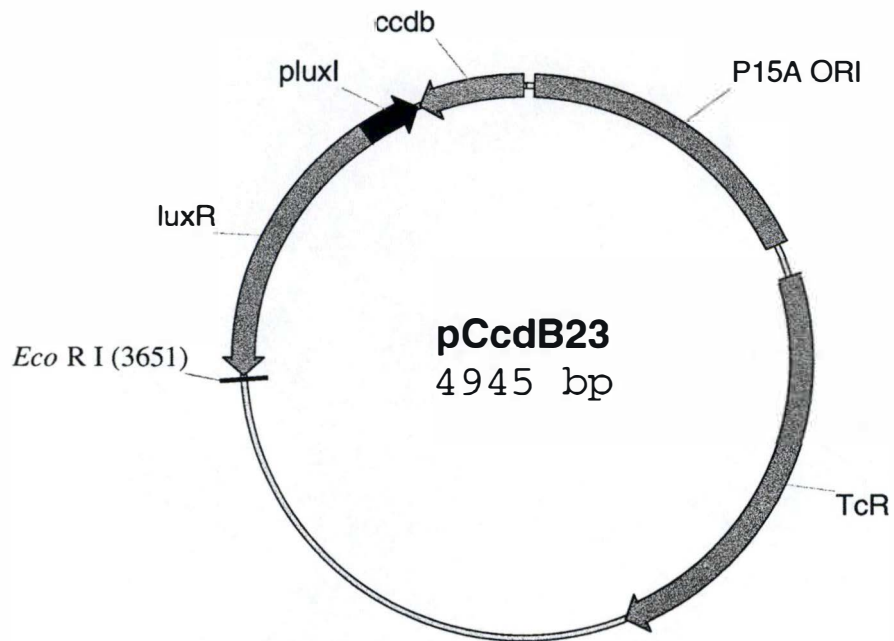


Figure 4 : Représentation du plasmide pCcdB23.

I.3. Milieux de culture et antibiotiques

Après préparation, les milieux sont stérilisés par autoclavage (20min. à 120°C).

I.3.1. Milieu Luria Bertani (LB)

- a. Forme liquide : -hydrolysate de caséine (peptone) 1g/100ml
 - NaCl 0.5g/100ml
 - Yeast extract 0.5g/100ml
- b. Forme solide : Ajouter 1,5% d'agar

I.3.2. Milieu SOC

- Yeast extract 0.5%
- Peptone 2%
- KCL 2.5 mM
- NaCl 10 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM
- Glucose 20 mM

I.3.3. Milieu minimum M9

- a. Forme liquide :
 - Na₂HPO₄ 6g/l
 - KH₂PO₄ 3g/l
 - NH₄Cl 1g/l
 - NaCl 0.5g/l
 - CaCl₂ 0.1 mM
 - MgSO₄ 1 mM
 - Glucose 10 mM
- b. Forme solide : Ajouter 1,5% d'agar

I.3.4. Antibiotiques

1. Ampicilline : 100 µg/ml
2. Streptomycine : 100 µg/ml
3. Tétracycline : 12.5 µg/ml
4. Chloramphénicol : 100 µg/ml

L'ampicilline a été utilisée pour sélectionner des bactéries transformées par le plasmide portant la banque de peptides. La streptomycine a été utilisée pour sélectionner les souches DB3.1 et DH10B. La tétracycline a été utilisée pour sélectionner des bactéries transformées par les plasmides pSB401, pCcdB5, pCcdB23, pPyrF18 et pPyrF15. Le chloramphénicol a été utilisé pour sélectionner la souche DL101.

II. Manipulation et analyse de l'ADN

II. 1. Extraction d'ADN plasmidique

II.1.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Une miniprep comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et sa resuspension.

Mode opératoire

- Ensemencer 5ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Centrifuger 1,5ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de S1 (RNase A 100 µg/ml, Tris-HCL 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, à conserver à 4°C)
- Ajouter 300 µl de S2 (NaOH 200 mM, SDS 1%, à conserver à température ambiante) et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 300 µl de S3 (Kac 3.0 M pH 5,5, à conserver à 4°C) et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes sur glace
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 14000 rpm) et récupérer le surnageant
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12500 rpm), éliminer le surnageant
- Laver l'ADN, en ajoutant 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12500 rpm). Éliminer prudemment l'éthanol
- Sécher le culot d'ADN
- Resuspendre dans 20 µl d'H₂O distillée stérile

II.1.2. Midipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

La midipréparation d'ADN comprend les mêmes étapes que la minipréparation d'ADN, mais permet d'obtenir une plus grande quantité d'ADN, plus purifié. Cette technique comprend l'utilisation d'une colonne dans un kit commercial Nucleobond AX 100 échangeuse d'anions qui permet de préparer l'ADN plasmidique en éliminant les protéines, l'ARN et l'ADN génomique.

Mode opératoire

- Préculture :ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie bactérienne
- Ensemencer avec 25 à 100 ml de ce même milieu liquide avec la préculture
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation
- Culoter la culture à 3000 rpm pendant 15 minutes, éliminer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 4 ml de S1
- Ajouter 4ml de S2 et mélanger doucement, laisser 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 4 ml de S3 et agiter doucement, laisser 15 minutes sur glace
- Centrifuger 25 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34),à 4°C et récupérer le surnageant
- Equilibrer la colonne avec 2 ml de tampon N2 (NaCl 50 mM, Ethanol 15%, Triton X-100 0,15%)
- Déposer le surnageant sur la colonne équilibrée
- Laver la colonne avec 2 X 4ml de tampon N3 (pH7,0 : NaCl 1M, MOPS 50 mM, Ethanol 15%)
- Eluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5 (NaCl 1,25 M, Tris-Hcl 50 mM, Ethanol 15%)
- Précipiter l'ADN avec 0.7 volume d'isopropanol
- Centrifuger 15 minutes à 4°C (à 12000 rpm) et éliminer le surnageant
- Laver à l'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 12000 rpm).Éliminer le surnageant
- Sécher le culot
- Resuspendre dans 100µl d'H₂O distillée stérile

b. Amplification de l'ADN au chloramphénicol

Le chloramphénicol inhibe la synthèse protéique en interagissant avec la sous-unité ribosomique 50S et par l'inhibition de la réaction catalysée par la peptidyltransférase. La réplication quant à elle continue et permet d'augmenter le nombre de copies d'un plasmide. Cet antibiotique est à utiliser à une concentration de 200 mg/l lorsque la culture bactérienne est à une DO comprise entre 0.8 et 1.

II.2. Restriction de l'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences souvent palindromiques de 4 à 6 paires de bases.

a. Mode opératoire

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée
- 1/10^{ème} de tampon de restriction 10x
- l'enzyme de restriction: au maximum 1/10^{ème} du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (1 unité correspondant à la quantité

d'enzyme nécessaire pour restreindre complètement 1 µg d'ADN du phage λ en 1 heure à 37°C dans un volume de 25 µl)

- Amener au volume final avec de l'eau distillée stérile
- Incuber au minimum 45 minutes à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C). L'enzyme peut être soit inactivée par chauffage (15 à 20 minutes à 65 °C) si l'enzyme est thermosensible, soit éliminée par une extraction phénol/chloroforme

b. Enzymes utilisées :

- *EcoRI* : G↓AATTC
- *SnaBI* : TAC↓GTA
- *Bst1107I* : GTA↓TAC

II.3. Extraction au phénol/chloroforme

Afin d'extraire les protéines d'une solution d'ADN, on utilise le mélange phénol/chloroforme. Des protéines dénaturées se trouvent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse.

Mode opératoire

- Porter le volume de la solution à un minimum de 100 µl
- Ajouter 1 volume d'une solution de phénol-chloroforme (1:1)
- Vortexer
- Centrifuger 5 minutes dans une microfuge à vitesse maximale
- Prélever avec précaution la phase supérieure, en évitant de reprendre l'interface
- Précipiter l'ADN à l'éthanol

II.4. Précipitation à l'éthanol

Mode opératoire

- A 1 volume de réaction, ajouter 1/10 NaAc 3 M pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol 100% froid (-20°C)
- Vortexer et placer 30 minutes à -80°C
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 30 minutes à 4 °C dans une minifuge, éliminer le surnageant prudemment
- Laver en ajoutant de l'éthanol 70% froid
- Centrifuger 5 minutes à 4 °C, éliminer le surnageant
- Resuspendre dans un volume adéquat d'eau stérile

II.5. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant comigrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille l'ADN du phage λ coupé par *Hind* III, le Smart Ladder et le Smart Ladder SF (« Small fragment ») commercialisés par la firme Eurogentec. Ces trois marqueurs de taille de l'ADN sont représentés aux figures 7, 8 et 9.

Les fragments d'ADN sont visualisés au moyen du bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescent, le bromure d'éthidium marque l'ADN et celui-ci est visible sous illumination UV. Il faut noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

a. Mode opératoire

- Immerger le gel dans une cuve d'Electrophorèse remplie de tampon TAE, auquel on a ajouté quelques μ l d'une solution de bromure d'éthidium
- Préparer les échantillons en ajoutant 1/10 de solution d'alourdisseur
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré (5V/cm)
- Visualiser le gel sous UV (transilluminateur de longueur d'onde 302 nm)

b. Solution, tampons et matériel

1. Solution de bromure d'éthidium :
 - 2 μ g/ml
2. Solution d'alourdisseur (10x) :
 - glycerol 50%
 - EDTA 100 mM
 - SDS 1%
 - Bleu de bromophénol
3. Tampon TAE (50 fois concentré) :
 - Tris-HCl, pH 8,0 40 mM
 - EDTA 0,002M
 - Acide acétique glacial 57,1 ml/litre

c. Extraction de l'ADN à partir de gel

Cette technique va permettre d'extraire la bande d'ADN intéressante à partir du gel d'agarose dans lequel il a migré. Dans un premier temps le gel est préparé et les échantillons sont chargés dans les pistes. Après migration et trempage dans une solution de bromure d'éthidium, le gel est révélé une fraction de seconde sur le banc U.V. Cette brève révélation permet de repérer la localisation de la bande d'ADN

d'intérêt. Cette bande est alors découpée du gel et l'ADN en est extrait. Cette technique permet de se débarrasser des fragments de restriction inutiles ou partiellement restreints. Elle est également utilisée pour éliminer les enzymes de restriction, de ligation, ou autres.

1. Réactifs : Le kit " QIAquick gel extraction " (QIAgen, Germany) a été utilisé pour ce type d'extraction.
2. Mode opératoire :
 - Exciser le plus petit morceau possible de gel contenant la bande d'ADN avec une lame scalpel propre
 - Ajouter 3 vol. de tampon QG à ce morceau de gel (100mg de gel = 100 µl) et incubé 10 minutes à 50°
 - Ajouter 1 vol. d'isopropanol peut augmenter le rendement de récupération si la taille des fragments attendus est inférieure à 500 pb ou supérieure à 4 kpb
 - Placer ce mélange (max. 800 µl) au centre d'une colonne de filtration " QIAquick spin column " fournie dans le kit. Cette colonne sera elle-même placée dans un tube collecteur et centrifugée une minute à 14000 rpm
 - Éliminer la solution récupérée dans le tube collecteur et laver la colonne en ajoutant à son sommet 0,75 ml de tampon BE et en centrifugeant une minute à 14000 rpm. Si l'ADN doit être utilisé par après dans des applications sensibles au sel, laisser le tampon BE 2 à 5 minutes sur la colonne avant de centrifuger
 - Éliminer la solution récupérée dans le tube collecteur et recentrifuger une minute à 14000 rpm
 - Eluer l'ADN en appliquant 30µl d'H₂O ou de tampon d'élution et en centrifugeant une minute à 14000 rpm. Le rendement peut être augmenté si l'H₂O ou de tampon d'élution sont laissés 1 minute sur la colonne avant la centrifugation

II.6. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Roche, 1U/µl). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyl 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme, pour être active, nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg²⁺.

Mode opératoire

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à liquer
- 1/10^{ème} du volume final de tampon de ligation 10x
- Le nombre d'unités de ligase nécessaire (dépendant de la quantité d'ADN)
- Compléter avec de l'eau distillée stérile
- Incuber, à 16°C une nuit pour des extrémités cohésives et minimum 3 heures à température ambiante pour des bouts francs

II.7. Transformations bactériennes

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

II.7.1. Electroporation bactérienne

L'électroporation est une méthode de transformation de bactéries, où un choc électrique permet l'introduction l'ADN exogène dans la bactérie.

a. Préparation de cellules compétentes

Par une suite de lavages, les bactéries sont désalées.

- Inoculer 500 ml de LB liquide avec 0,5 ml d'une culture fraîche de bactérie *E. coli*
- Incuber les bactéries à 37°C sous forte agitation jusqu'à ce que la culture ait atteint une D.O. de 0,5 à 0,8 à 550 nm (phase mi-log de croissance)
- Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace, culoter les bactéries en centrifugeant à 4°C, à 3000 rpm pendant 15 minutes
- -Eliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 500 ml d'H₂O stérile froide
- Centrifuger
- Resuspendre dans 250 ml d' H₂O froide et centrifuger
- Resuspendre dans 10 ml d' H₂O froide contenant 10% de glycérol. Centrifuger
- Resuspendre dans un volume final de 1 à 2 ml d' H₂O froide contenant 10% de glycérol. (la concentration cellulaire est d'environ 1 à 3.10¹⁰ cellules/ml)
- Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C

b. Electroporation

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace
- Placer dans un eppendorf stérile, dans 100 µl de cellules compétentes, ajouter l'ADN plasmidique ou le mélange de ligation
- Mélanger et placer la solution 1 minute sur glace
- Transférer dans la cuvette d'électroporation, refroidie sur glace, le contenu de l'eppendorf
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene Pulser™)
- Régler l'appareil sur: capacitance 25 µF, résistance 200 Ω, différence de potentiel 2 KV
- Décharger le condensateur (choc électrique)
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC
- Transférer dans un eppendorf et laisser 1 heure à 37°C
- Etaler sur milieu sélectif et laisser pousser une nuit à 37°C

II.7.2 Transformation chimique

Pour cette transformation, la paroi et la membrane bactérienne sont rendues perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente (figure 10).

Des bactéries Gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl_2). Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule. Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont ensuite isolés par culture sur boîte de milieu sélectif.

a. Préparation de cellules compétentes

- Ensemencer 100 ml de LB+ antibiotique à partir d'une préculture. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0,3 à 550 nm (début de la phase exponentielle)
- Arrêter la croissance en refroidissant la culture sur glace pendant 10 minutes
- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 50mM. Répéter cette étape une seconde fois
- Laisser la solution 30 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide en CaCl_2 50mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial
- Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80 °C

b. Transformation des cellules compétentes

- A 50 à 150 µl de cellules compétentes, ajouter environ 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN
- Déposer 30 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique de 2 minutes à 42°C
- Ajouter 900 µl de SOC liquide
- Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C

c. Témoins de transformation

- Un témoin de compétence : des cellules compétentes transformées avec une quantité précise d'un plasmide non restreint sont étalées sur milieu sélectif

- Un témoin de viabilité des cellules compétentes : des cellules compétentes après transformation, sont étalées sur milieu LB

II.7.3. Méthode de transformation rapide

Les cellules TSB compétentes permettent d'effectuer un grand nombre de transformations en peu de temps. Cette méthode a notamment été utilisée lors du traitement des plasmides-peptides candidats, ce qui nous a permis d'effectuer 60 transformations et de traiter tous les clones sur la même journée.

a. Préparation des cellules compétentes

- Ensemencer 100ml de LB+ antibiotique à partir d'une préculture. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0,3-0,4 à 550 nm
- Centrifuger la culture 10 minutes à 2000 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de TSB égal au dixième du volume initial

b. Transformation des cellules compétentes

- A 100 µl de cellules compétentes, ajouter environ 10 µl de mélange de ligation ou 10 à 100 ng d'ADN
- Déposer 30 minutes sur glace
- Ajouter 900 µl de TSB et 20 µl de glucose 20%
- Incuber 1 heure à 37°C
- Etaler sur boîtes de milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C

c. Solution de TSB

- Milieu de culture LB liquide
- 10% de PEG
- 5% de DMSO
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄

Solution filtrée et stockée à 4°C

II.8. Amplification d'ADN par PCR

II.8.1 PCR classique

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens". Une ADN polymérase thermostable, telle que la Taq (Biotools) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Un cycle consiste en 3 étapes:

1. dénaturation des brins d'ADN
2. hybridation des amorces
3. élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire).

En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible. Le T_m des amorces se calcule de la façon suivante (pour des oligos d'une taille inférieure à 20 bases) : 4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *ccdB* sont :

- *ccdB* amont : 5'-GTATGCAGTTTAAGGTTTACACC
- *ccdB* aval : 5'-TACTTATATTCCCCAGAACATCAG

Pour l'amplification du gène *pyrF* :

- *pyrF* amont : 5'-GTATGACGTAACTGCTTCATC
- *pyrF* aval : 5'-TACTCATGCACTCCGCTGTAAAG

Pour la recherche des clones comportant la construction attendue :

- *phxI* amont : 5'-CCGAATTCCTCGAGGATTTTGTACACTATTGTA

Pour le séquençage des constructions plasmidiques :

- *phxI* aval : 5'-GGGAATTCCAACCTCCCTTGCGTTTA
- pSB401 amont : 5'-TGGAAAACGGTGTAACAAGGG

Pour le séquençage des peptides de la banque :

- BQLenstra amont : 5'-GCCAGACGCGAATTATTTTGTG
- BQLenstra aval : 5'-CTAGAGCCGCATCGATCCGGATC

a. Mode opératoire

- Mélange de réaction réalisé dans un microtube:
- Tampon d'ADN polymérase 10X à une concentration finale 1X
- dNTP à une concentration finale de 0,2 mM
- Primer 1 à une concentration finale de 0,2 μ M
- Primer 2 à une concentration finale de 0,2 μ M
- Polymérase à raison de 1,245 U/ml au final
- Porter à 50 μ l avec de l'eau distillée stérile

b. Programme utilisé pour toutes les amplifications PCR

- Dénaturation de 5 minutes à 95°C.
- 30 cycles d'amplification divisé en 3 étapes:
 - 30 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 30 sec. à 50°C pour l'hybridation
 - 1 min. à 72°C pour la polymérisation
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

II.8.2. PCR sur colonies

Pour cette méthode, l'ADN n'est pas récupéré des clones bactériens. Une partie de la colonie est additionnée au mélange PCR et c'est lors de la première dénaturation à 95°C que les cellules sont lysées et libèrent leur ADN.

II.8.3 Purification du produit PCR

Nous utilisons le kit "High pure PCR Product Purification kit", de Roche Le principe est le suivant: les acides nucléiques se lient spécifiquement à la surface de fibre de silice en présence de sels. La liaison de l'ADN étant totalement spécifique, il est facile de laver l'ADN de toutes les impuretés, comme les sels, nucléotides libres ou protéines, et ce en une seule étape.

a. Mode opératoire

- Porter le volume du produit PCR à 100 µl et y ajouter 500 µl de tampon de liaison (Binding buffer). Mélanger
- Verser le contenu du mélange dans une colonne, contenant le filtre. La colonne est préalablement mise dans un tube collecteur
- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm dans la microfuge
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne
- Appliquer 500 µl du tampon de lavage sur la colonne (Wash buffer)
- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm dans la microfuge
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne
- Recommencer l'opération avec 200 µl de Wash buffer
- Insérer la colonne dans un Eppendorf propre
- Eluer avec 100 µl d'eau pure
- Conserver à -20°C
- Pour vérifier la purification, mettre 1/10 du produit de purification sur gel d'agarose

b. Solutions

Composition du Binding buffer:

- guanidine-thiocyanate 3M
- Tris-HCl 10mM, pH 6,6
- Ethanol 5%

Composition du Wash buffer:

- NaCl 20 mM
- Tris-HCl 2 mM, pH 7,5
- Ajouter 40 ml d'éthanol à 200ml du tampon avant utilisation.

II.9. Séquençage d'ADN

Pour séquencer des fragments d'ADN nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer). Le principe appliqué dans ce kit est un cycle séquentiel avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués avec des molécules fluorescentes. Chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique. La réaction

de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotides arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représentent la séquence d'ADN

Mode opératoire

- La concentration en ADN matrice doit être de 0.1 µg/µl si c'est un fragment monocaténaire, 0.2µg/µl s'il est bicaténaire et 10 à 30 ng/µl de produit PCR. Lorsqu'on utilise un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage
- La quantité d'amorce doit être de 3.2 pM
- 8µl de « terminator ready reaction mix » sont ajoutés ensuite. Cette solution contient les 4 didéoxynucléotides marqués à la fluoréscéine, du Tris-HCl (pH 9), du MgCl₂, une pyrophosphatase stable, l'ampliTaQ ADN polymérase FS, dITP, dATP, dTTP, dCTP. Le dITP remplace le dGTP ce qui évite la compression des bandes lors de l'électrophorèse L'ampliTaQ ADN polymérase FS remplace la Taq polymérase classique car elle est plus efficace pour l'incorporation de nucléotides marqués
- Les temps de réaction préalablement réglés sur l'appareil PCR sont ceux appliqués en générale
- Après la réaction, il est nécessaire de purifier l'ADN car de nombreux nucléotides marqués n'ont pas été incorporés dans la réaction de polymérisation. Leur présence pourrait perturber l'électrophorèse dans le séquenceur. Pour cette purification nous avons suivi le protocole suivant :
 - Ajouter 2µl de NaAc 3M pH4.8
 - Ajouter 50µl d' EtOH 95%
 - Mettre 10 ' sur glace
 - Centrifuger 20' dans une minifuge à vitesse maximale
 - Eliminer le surnageant
 - Ajouter 250µl d'EtOH 70% à 4°C
 - Centrifuger pendant 20 minutes
 - Eliminer l'EtOH, laisser sécher à l'air
- Les produits sont séparés suivant leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur (ABI PRISM 377)

II.10. Spectrophotométrie

L' ADN possède un maximum d'absorption à 260nm. Pour connaître sa concentration, il suffit donc de mesurer l'absorbance d'une solution purifiée d'ADN à cette longueur d'onde et de connaître son coefficient d'extinction molaire (ϵ)

$$C = \epsilon / \text{Abs}$$

C = concentration
en
M/litre.
 ϵ = coeff.

En pratique on calibre tout d'abord le spectrophotomètre avec le tampon dans lequel l'ADN se trouve. Une première mesure est effectuée à 260nm comme référence. L'absorbance du tampon est ensuite mesurée à 280nm. Une fois le spectrophotomètre calibré par la référence du tampon, l'absorbance de l'échantillon d'ADN est mesurée à 260nm et à 280nm.

La valeur de l'absorbance nous donne une idée de la concentration alors que le rapport de l'absorbance à 260nm sur l'absorbance à 280nm nous donne aussi une estimation de la pureté de l'échantillon. Un rapport de 1,6 correspond à une courbe typique d'absorbance de l'ADN. Si le rapport s'éloigne de 1,6 c'est que la solution est contaminée par une molécule possédant un spectre d'absorbance différent.

III. Tests de luminescence

III.1. Test de luminescence sur colonies

Ce test permet de détecter la production de lumière par une colonie bactérienne.

Mode opératoire

- Déposer 1 μ l d'OHL sur les boîtes de milieu solide comportant les colonies
- Incuber 2 h à 30°C
- La production de lumière est ensuite évaluée au moyen d'une caméra (Fluorimager BioRad) fonctionnant comme un appareil photographique. Les boîtes sont en fait placées dans une chambre noire au-dessus de laquelle se trouve l'objectif. Ensuite, le diaphragme s'ouvre pendant un temps déterminé et une photographie est prise

III.2. Test de luminescence en culture liquide

Les tests de luminescence effectués en culture liquide ont été effectués au moyen de plaque multipuits qui se présentent comme suit :

- Colonnes 1 et 7 : 4 ng
- Colonnes 2 et 8 : 0.8 ng
- Colonnes 3 et 9 : 0.16 ng
- Colonnes 4 et 10 : 0.032 ng
- Colonnes 5 et 11 : .0064 ng
- Colonnes 6 et 12 : ng

Différentes quantité d'OHHL ont été testées, de 4 ng à 0,0064 ng (dilution de 5 en 5). Ensuite, les DO à 550 nm ont été prises pour chacune des 30 cultures bactériennes étudiées et ont été ajustées à une valeur de DO^{550} égal à 0,3, pour chacune des cultures. Puis 100 μ l de chacune des cultures à DO^{550} ont été ajoutés aux puits des plaques, de la façon suivante : les puits 1 à 6 d'une ligne correspondent à un clone et les puits 7 à 12 de la même ligne correspond au même clone mais provenant d'une culture indépendante. Pour tester la production de lumière de nos 30 cultures, deux plaques ont été préparées de cette façon. Ces deux plaques ont ensuite été incubées à 30 °C. Les mesures de luminescence ont été prises au luminomètre.

Bibliographie

Adar, Y. Y., Simaan, M., and Ulitzur, S. (1992). Formation of the LuxR protein in the *Vibrio fischeri lux* system is controlled by HtpR through the GroESL proteins. *J. bacteriol.* 174 (22), 7138-7143.

Bahassi, E. M., O'Dea, M. H., Allali, N., Messens, J., Gellert, M., and Couturier, M. (1999). Interactions of CcdB with DNA Gyrase. *J. Biol. Chem.* 274 (16), 10936-10944.

Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other : regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582-587.

Blum, J. H., Dove, S. L., Hochschild, A., and Mekalanos, J. J. (2000). Isolation of peptide aptamers that inhibit intracellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 (5), 2241-2246.

Choi, S. H., and Greenberg, E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 11115-11119.

Choi, S. H., and Greenberg, E. P. (1992). Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR Protein. *J. bacteriol.* 174 (12), 4064-4069.

Cohen, A. B., Colas, P., and Brent, R. (1998). An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 14272-14277.

Colas, P., Cohen, A. B., Jessen, T., McCoy, J., and Brent, R. (1996). Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 380, 548-550.

Couturier, M., Bahassi, E. M., and Van Melderren, L. (1998). Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends in Microbiol.* 6 (7), 269-275.

De Kievit, T. R., and Iglewski, B. H. (2000). Bacterial Quorum Sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 68 (9), 4839-4849.

Dolan, K. M., and Greenberg, E. P. (1992). Evidence that GroEL, not σ^{32} , is involved in transcriptional regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes in *Escherichia coli*. *J. bacteriol.* 174 (15), 5132-5135.

Dunlap, P. V., and Greenberg, E. P. (1988). Control of *Vibrio fischeri lux* gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-LuxR protein regulatory circuit. *J. bacteriol.* 170 (9), 4040-4046.

- Dunlap, P. V., and Kuo, A. (1992). Cell density-dependent modulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system in the absence of autoinducer and LuxR protein. *J. bacteriol.* 174 (8), 2440-2448.
- Dunlap, P. V. (1999). Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. : *J. Mol. Microbiol Biotechnol.* 1 (1), 5-12.
- Dunlap, P. V., and Callahan, S. M. (2000). LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-lux genes define a Quorum-Sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J. bacteriol.* 182 (10), 2811-2822.
- Dunny, G. M., and Winans, S. C. (1999), Bacterial life : Neither lonely nor boring. *Cell-Cell Sign. in Bact.*, 1-5.
- Eberhard, A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. bacteriol.* 109, 1101-1105.
- Egland, K. A., and Greenberg, E. P. (1999). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. *Mol. Microbiol.* 31 (4), 1197-1204.
- Egland, K. A., and Greenberg, E. P. (2000). Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J. bacteriol.* 182 (3), 805-811.
- Egland, K. A., and Greenberg, E. P. (2001). Quorum sensing in *Vibrio fischeri* : analysis of the LuxR DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis. *J. bacteriol.* 183 (1), 382-386.
- Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1999). Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol* 53, 43-70.
- Frangioni, J. V., LaRicca, L. M., and Montminy M. R. (2000). Minimal activators that bind to the KIX domain of p300/CBP identified by phage display screening. *Nature biotechnology* 18, 1080-1085.
- Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems : The LuxR-LuxI family of Quorum Sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 727-751.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum Sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. bacteriol.* 176 (2), 269-275.
- Fuqua, C., and Greenberg, E. P. (1998). Self perception in bacteria : quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 183-189.
- Gallop, M. A., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. A., and Gordon, E. M. (1994). Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *Journal of Medicinal Chemistry* 37(9), 1233-1250.
- Geyer, C. R., Colman-Lerner, A., and Brent R. (1999). "Mutagenesis" by peptide aptamers identifies genetic network members and pathway connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 8567-8572.

- Gilson, L., Kuo, A., and Dunlap, P. V. (1995). AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. bacteriol.* 177 (23), 6946-6951.
- Givskov, M., De Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., and Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone mediated prokaryotic signalling. : *J. bacteriol.* 178 (22), 6618-6622.
- Gordon, E. M., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. A., and Gallop, M. A. (1994). Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2 : Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *Journal of Medicinal Chemistry* 37(10), 1385-1401.
- Gray, K. M., Passador, L., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. (1994). Interchangeability and specificity of components from the Quorum-Sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. bacteriol.* 176 (10), 3076-3080.
- Greenberg, E. P. (1997). Quorum Sensing in Gram-Negative bacteria. *ASM News* 63 (7), 371-377.
- Hancock, R. E. W., and Chapple, D. S. (1999). Minireview : Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43 (6), 1317-1323.
- Hanzelka, B. L., and Greenberg, E. P. (1995). Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J. bacteriol.* 177 (3), 815-817.
- Hanzelka, B. L., and Greenberg, E. P. (1996). Quorum Sensing in *Vibrio fischeri* : evidence that S-Adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. bacteriol.* 178 (17), 5291-5294.
- Hanzelka, B. L., Stevens, A. M., Parsek, M. R., Crone, T. J., and Greenberg, E. P. (1997). Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide : critical regions of an autoinducer synthase. *J. bacteriol.* 179 (15), 4882-4887.
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan, J. E., and Greenberg, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS Protein. *J. bacteriol.* 181 (18), 5766-5770.
- Holden, M., Swift, S., and Williams, P. (2000). New signal molecules on the Quorum Sensing block. *Trends in Microbiol.* 8 (3), 101-104.
- Hyde-DeRuyscher, R., Paige, L. A., Christensen, D. J., Hyde-DeRuyscher, N., Lim, A., Fredericks, Z. L., Kranz, J., Gallant, P., Zhang, J., Rocklage, S. M., Fowlkes, D. M., Wendler, P. A., and Hamilton, P. T. (1999). Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Chemistry & Biology* 7 (1), 17-25.
- Jensen, K. F., Larsen, J. N., Schack, L., and Sivertsen, A. (1984). Studies on the structure and expression of *Escherichia coli* *pyrC*, *pyrD*, and *pyrF* using the cloned genes. *Eur. J. Biochem.* 140 (2), 343-352.

- Kampranis, S. C., Howells, A. J., and Maxwell, A. (1999). The interaction of DNA gyrase with the bacterial toxin CcdB : evidence for the existence of two gyrase-CcdB complexes. *J. Mol. Biol.* 293 (3), 733-744.
- Kaplan, H. B., and Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. bacteriol.* 174 (15), 1210-1214.
- Kaplan, H. B., and Greenberg, E. P. (1987). Overproduction and purification of the *luxR* gene product, the transcriptional activator of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 6639-6643.
- Kolibachuk, D., and Greenberg, E. P. (1993). The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. *J. bacteriol.* 175 (22), 7307-7312.
- Kolonin, M. G., and Finley, R. L. (1998). Targeting cyclin-dependent kinases in *Drosophila* with peptide aptamers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 14266-14271.
- Kuo, A., Blough, N. V., and Dunlap, P. V. (1994). Multiple *N*-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J. bacteriol.* 176 (24), 7558-7565.
- Kuo, A., Callahan, S. M., and Dunlap, P. V. (1996). Modulation of luminescence operon expression by *N*-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. *J. bacteriol.* 178 (4), 971-976.
- Lenstra, J. A., Erkens, J. H. F., Langeveld, J. G. A., Posthumus, W. P. A., Meloen, R. H., Gebauer, F., Correa, I., Enjuanes, L., and Stanley, K. K. (1992). Isolation of sequences from a random-sequence expression library that mimic viral epitopes. *J. Immunol. Methods* 152, 149-157.
- Norman, T. C., Smith, D. L., Sorger, P. K., Drees, B. L., O'Rourke, S. M., Hughes, T. R., Roberts, C. J., Friend, S. H., Fields, S., and Murray, A. W. Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science* 285, 591-595.
- Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone Quorum Sensing in Gram-negative bacteria : a signalling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 (16), 8789-8793.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., and Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone Quorum-Sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 4360-4365.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 197-201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. (1995). A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 1490-1494.
- Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., and Williams, A. (1995). The bacterial "enigma" : cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* 16 (4), 615-624.

Schaefer, A. L., Hanzelka, B. L., Eberhard, A., and Greenberg, E. P. (1996a). Quorum Sensing in *Vibrio fischeri* : probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J. bacteriol.* 178 (10), 2897-2901.

Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., and Greenberg, E. P. (1996b). Generation of cell-to-cell signals in Quorum Sensing : Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 9505-9509.

Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. (1991). The *Vibrio fischeri* LuxR protein is capable of bidirectional stimulation of transcription and both positive and negative regulation of the *luxR* gene. *J. bacteriol.* 173 (2), 568-574.

Sitnikov, D. M., Schineller, J. B., and Baldwin, T. O. (1995). Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol. Microbiol.* 17 (5), 801-812.

Stevens, A. M., Dolan, K. M., and Greenberg, E. P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 12619-12623.

Stevens, A. M., and Greenberg, E. P. (1997). Quorum Sensing in *Vibrio fischeri* : essential elements for activation of the luminescence genes. *J. bacteriol.* 179 (2), 557-562.

Stevens, A. M., Fujita, N., Ishihama, A., and Greenberg, E. P. (1999). Involvement of the RNA polymerase-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J. bacteriol.* 181 (15), 4704-4707.

Trott, A. E., and Stevens, A. M. (2001). Amino acid residues in LuxR critical for its mechanism of transcriptional activation during Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*. *J. bacteriol.* 183 (1), 387-392.

Turnbough, C. L., Kerr, K. H., Fundenburg, W. R., Donahue, J. P., and Powell, F. E. (1987). Nucleotide sequence and characterization of the *pyrF* operon of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 262 (21), 10239-10245.

Ulitzur, S. (1998). LuxR controls the expression of *Vibrio fischeri* *luxCDABE* clone in *Escherichia coli* in the absence of *luxI* gene. *J. Biolumin. Chemilumin.* 13 (6), 365-369.

Val, D. L., and Cronan, J. E. (1998). *In vivo* evidence that *S*-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J. bacteriol.* 180 (10), 2644-2651.

Williams, A., Camara, M., Hardman, A., Swift, D., M., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. I., and Bycroft, B. W. (2000). Quorum Sensing and the population-dependent control of virulence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355, 667-680.

Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jorgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., and Stewart, G. S. A. B. (1998). Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Letters* 163, 185-192.

Withers, H., Swift, S., and Williams, P. (2001). Quorum Sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. . *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 186-193.